

**Die Glutamyl-tRNA Reduktase**  
**aus *Escherichia coli***

**Substraterkennung und Interaktion mit der**  
**Glutamat-1-semialdehyd-2,1-Aminomutase**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Corinna Lürer  
aus Osnabrück

1. Referent: Professor Dr. Dieter Jahn  
2. Referent: Honorarprofessor Dr. Dirk Heinz  
eingereicht am: 04.06.2007  
mündliche Prüfung (Disputation) am: 19.07.2007

Druckjahr 2007

## **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### **Publikationen**

Schauer, S., Lüer, C. & Moser, J. (2003) Large scale production of biologically active *Escherichia coli* glutamyl-tRNA reductase from inclusion bodies. *Protein. Expr. Purif.* **31**, 271-275

Lüer, C., Schauer, S., Möbius, K., Schulze, J., Schubert, W.-D., Heinz, D. W., Jahn, D. & Moser, J. (2005) Complex formation between glutamyl-tRNA reductase and glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase in *Escherichia coli* during the initial reactions of porphyrin biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **280**, 18568-18572

### **Eingereichte Publikationen**

Lüer, C., Schauer, S., Virus, S., Schubert, W.-D., Heinz, D. W., Moser, J. & Jahn, D. (2007) Glutamate recognition and hydride transfer by *Escherichia coli* glutamyl-tRNA reductase. Manuskript eingereicht bei *FEBS Journal*.

### **Tagungsbeiträge**

Lüer, C., Möbius, K., Schauer, S., Moser, J., Schubert, W.-D., Heinz, D. W., Jahn, D. (2005) Active site engineering of glutamyl-tRNA reductase, the initial enzyme of tetrapyrrole biosynthesis. 6<sup>th</sup> International Conference on Tetrapyrrole Photoreceptors in Photosynthetic Organisms, Luzern, Schweiz, 11-16/09 (Poster)

## **Bernward und meiner Familie**

*„Die Neugier steht immer an erster Stelle eines Problems, das gelöst werden will.“*

Galileo Galilei

# Inhaltsverzeichnis

|            |                                                                                                                            |           |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b>   | <b>Einleitung.....</b>                                                                                                     | <b>1</b>  |
| <b>1.1</b> | <b>Tetrapyrrole – die Farbstoffe des Lebens.....</b>                                                                       | <b>1</b>  |
| 1.1.1      | Bedeutung und Struktur der Tetrapyrrole.....                                                                               | 1         |
| 1.1.2      | Überblick über die Tetrapyrrolbiosynthese .....                                                                            | 3         |
| 1.1.3      | Biosynthese der Tetrapyrrole ausgehend von 5-Aminolävulinsäure .....                                                       | 5         |
| 1.1.3.1    | Die Biosynthese von Sirohäm, Coenzym F <sub>430</sub> , Corrinoiden und Häm d <sub>1</sub> ausgehend von Precorrin-2 ..... | 5         |
| 1.1.3.2    | Die Biosynthese von Häm und Chlorophyll .....                                                                              | 6         |
| <b>1.2</b> | <b>Synthesewege der 5-Aminolävulinsäure .....</b>                                                                          | <b>7</b>  |
| 1.2.1      | Der Shemin-Syntheseweg.....                                                                                                | 7         |
| 1.2.2      | Der C <sub>5</sub> -Syntheseweg .....                                                                                      | 8         |
| 1.2.3      | Regulation der ALA-Synthese.....                                                                                           | 9         |
| <b>1.3</b> | <b>Die Komponenten des C<sub>5</sub>-Synthesewegs .....</b>                                                                | <b>10</b> |
| 1.3.1      | Die Glutamat-1-semialdehyd-2,1-Aminomutase.....                                                                            | 10        |
| 1.3.2      | Die Glutamat-spezifische tRNA .....                                                                                        | 12        |
| 1.3.3      | Die Glutamyl-tRNA Reduktase .....                                                                                          | 14        |
| <b>1.4</b> | <b>Zielsetzung .....</b>                                                                                                   | <b>18</b> |
| <b>2</b>   | <b>Material und Methoden.....</b>                                                                                          | <b>19</b> |
| <b>2.1</b> | <b>Geräte und Chemikalien .....</b>                                                                                        | <b>19</b> |
| 2.1.1      | Geräte.....                                                                                                                | 19        |
| 2.1.2      | Chemikalien und Hilfsmittel.....                                                                                           | 19        |
| <b>2.2</b> | <b>Bakterienstämme und Plasmide .....</b>                                                                                  | <b>20</b> |
| 2.2.1      | Bakterienstämme: <i>Escherichia coli</i> .....                                                                             | 20        |
| 2.2.2      | Plasmide.....                                                                                                              | 21        |
| <b>2.3</b> | <b>Medien und Medienzusätze.....</b>                                                                                       | <b>22</b> |
| 2.3.1      | Medien .....                                                                                                               | 22        |
| 2.3.2      | Medienzusätze .....                                                                                                        | 22        |
| <b>2.4</b> | <b>Mikrobiologische Techniken.....</b>                                                                                     | <b>22</b> |
| 2.4.1      | Sterilisation .....                                                                                                        | 22        |
| 2.4.2      | Bakterienkultivierung .....                                                                                                | 23        |
| 2.4.3      | Bestimmung von Zelldichten.....                                                                                            | 24        |
| 2.4.4      | Lagerung von Bakterien.....                                                                                                | 24        |
| <b>2.5</b> | <b>Molekularbiologische Methoden .....</b>                                                                                 | <b>24</b> |
| 2.5.1      | Herstellung elektrokompenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen.....                                                          | 24        |
| 2.5.2      | Transformation elektrokompenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen.....                                                       | 25        |
| 2.5.3      | Herstellung chemisch kompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen.....                                                      | 25        |
| 2.5.3.1    | Lösungen zur Herstellung chemisch kompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen .....                                        | 26        |
| 2.5.4      | Transformation chemisch kompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen.....                                                   | 26        |

|            |                                                                                                                                      |           |
|------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.5.5      | Präparation von Plasmid-DNA .....                                                                                                    | 26        |
| 2.5.5.1    | Lösungen zur Präparation von Plasmid-DNA .....                                                                                       | 27        |
| 2.5.6      | Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....                                                                                     | 27        |
| 2.5.7      | Agarosegelelektrophorese .....                                                                                                       | 28        |
| 2.5.7.1    | Lösungen für die Agarosegelelektrophorese .....                                                                                      | 28        |
| 2.5.8      | DNA-Sequenzierung .....                                                                                                              | 28        |
| <b>2.6</b> | <b>Proteinproduktion und -reinigung .....</b>                                                                                        | <b>30</b> |
| 2.6.1      | Rekombinante Produktion und chromatographische Reinigung der<br><i>Escherichia coli</i> Glutamyl-tRNA Reduktase .....                | 30        |
| 2.6.1.1    | Bakterienkultivierung .....                                                                                                          | 30        |
| 2.6.1.2    | Zellaufschluss und Reinigung der Einschlusskörper .....                                                                              | 30        |
| 2.6.1.3    | Faltung der Glutamyl-tRNA Reduktase aus „inclusion bodies“ mittels<br>Ni <sup>2+</sup> -beladener Chelating Sepharose™ .....         | 31        |
| 2.6.1.4    | Trennung von unspezifischen Proteinaggregaten der Glutamyl-tRNA<br>Reduktase durch Gelpermeationschromatographie .....               | 32        |
| 2.6.1.5    | Lösungen zur Reinigung und Faltung der Glutamyl-tRNA Reduktase .....                                                                 | 32        |
| 2.6.2      | Rekombinante Produktion und chromatographische Reinigung der<br><i>Escherichia coli</i> Glutaminyl-tRNA Synthetase .....             | 33        |
| 2.6.2.1    | Bakterienkultivierung .....                                                                                                          | 33        |
| 2.6.2.2    | Zellaufschluss .....                                                                                                                 | 34        |
| 2.6.2.3    | Erste Anionenaustauschchromatographie an MonoQ .....                                                                                 | 34        |
| 2.6.2.4    | Zweite Anionenaustauschchromatographie an MonoQ .....                                                                                | 34        |
| 2.6.2.5    | Lösungen zur Reinigung der <i>Escherichia coli</i> Glutaminyl-tRNA<br>Synthetase .....                                               | 35        |
| 2.6.3      | Rekombinante Produktion und chromatographische Reinigung der<br><i>Escherichia coli</i> Glutamyl-tRNA Synthetase .....               | 35        |
| 2.6.3.1    | Bakterienkultivierung .....                                                                                                          | 36        |
| 2.6.3.2    | Zellaufschluss .....                                                                                                                 | 36        |
| 2.6.3.3    | Zwei-Phasen-Verteilung .....                                                                                                         | 36        |
| 2.6.3.4    | Anionenaustauschchromatographie an MonoQ .....                                                                                       | 37        |
| 2.6.3.5    | Gelpermeationschromatographie .....                                                                                                  | 37        |
| 2.6.3.6    | Lösungen zur Reinigung der <i>Escherichia coli</i> Glutamyl-tRNA<br>Synthetase .....                                                 | 37        |
| 2.6.4      | Rekombinante Produktion und chromatographische Reinigung der<br><i>Escherichia coli</i> Glutamat-1-semialdehyd-2,1-Aminomutase ..... | 38        |
| 2.6.4.1    | Bakterienkultivierung .....                                                                                                          | 38        |
| 2.6.4.2    | Zellaufschluss .....                                                                                                                 | 38        |
| 2.6.4.3    | Anionenaustauschchromatographie an DEAE Sepharose™ .....                                                                             | 39        |
| 2.6.4.4    | Anionenaustauschchromatographie an MonoQ .....                                                                                       | 39        |
| 2.6.4.5    | Gelpermeationschromatographie .....                                                                                                  | 39        |
| 2.6.4.6    | Lösungen zur Reinigung der Glutamat-1-semialdehyd-2,1-<br>Aminomutase .....                                                          | 40        |
| 2.6.5      | Dialyse .....                                                                                                                        | 40        |
| 2.6.6      | Konzentrierung von Proteinlösungen .....                                                                                             | 40        |
| <b>2.7</b> | <b>Proteincharakterisierung .....</b>                                                                                                | <b>41</b> |
| 2.7.1      | Bestimmung von Proteinkonzentrationen .....                                                                                          | 41        |
| 2.7.1.1    | Bestimmung von Proteinkonzentrationen mittels Photometer .....                                                                       | 41        |
| 2.7.1.2    | Proteinbestimmung mittels BioRad Protein Test .....                                                                                  | 41        |
| 2.7.2      | Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....                                                                         | 42        |

|            |                                                                                                                       |           |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.7.2.1    | Lösungen zur SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....                                                                 | 42        |
| 2.7.3      | Westernblotanalyse.....                                                                                               | 44        |
| 2.7.3.1    | Lösungen für den Westernblot.....                                                                                     | 45        |
| 2.7.4      | Messungen mittels Cirkulärem Dichroismus (CD) .....                                                                   | 46        |
| 2.7.5.1    | Lösungen für die CD-Spektroskopie .....                                                                               | 47        |
| <b>2.8</b> | <b>Glutamyl-tRNA Reduktase Aktivitätstest.....</b>                                                                    | <b>47</b> |
| 2.8.1      | Herstellung der Substrate für die Glutamyl-tRNA Reduktase.....                                                        | 47        |
| 2.8.1.1    | Glutamyl-tRNA <sup>Glu</sup> .....                                                                                    | 47        |
| 2.8.1.2    | Glutaminyl-tRNA <sup>Glu</sup> .....                                                                                  | 47        |
| 2.8.1.3    | Lösungen zur Substratherstellung.....                                                                                 | 48        |
| 2.8.2      | Reinigung aminoacylierter tRNA .....                                                                                  | 48        |
| 2.8.3      | Glutamyl-tRNA Reduktase Aktivitätstest (Depletionstest).....                                                          | 49        |
| 2.8.3.1    | Lösungen für den Glutamyl-tRNA Reduktase Aktivitätstest .....                                                         | 50        |
| 2.8.4      | Identifizierung der Glutamyl-tRNA Reduktase Reaktionsprodukte mittels HPLC.....                                       | 50        |
| 2.8.4.1    | Lösungen für die HPLC .....                                                                                           | 51        |
| 2.8.5      | Bestimmung der GluTR-Esterase-Aktivität mittels 4-Nitrophenylacetat .....                                             | 51        |
| 2.8.5.1    | Lösungen für die Bestimmung der GluTR-Esterase-Aktivität mittels 4-Nitrophenylacetat .....                            | 51        |
| <b>2.9</b> | <b>Protein-Protein-Wechselwirkungsstudien.....</b>                                                                    | <b>52</b> |
| 2.9.1      | Co-Immunopräzipitation.....                                                                                           | 52        |
| 2.9.2      | Entfernung von unspezifischen Antikörpern aus dem Kaninchen anti-GluTR Serum .....                                    | 52        |
| 2.9.3      | <i>In vivo</i> Co-Immunopräzipitation.....                                                                            | 53        |
| 2.9.4      | <i>In vitro</i> Co-Immunopräzipitation.....                                                                           | 53        |
| 2.9.5      | Lösungen für die Co-Immunopräzipitation .....                                                                         | 54        |
| 2.9.6      | Bestimmung der Komplex-Bindungskonstante mittels der Hummel/Dreyer Methode .....                                      | 54        |
| 2.9.7      | Lösungen für die Hummel/Dreyer Analyse.....                                                                           | 55        |
| <b>3.</b>  | <b>Ergebnisse und Diskussion.....</b>                                                                                 | <b>56</b> |
| <b>3.1</b> | <b>Substraterkennung durch die <i>Escherichia coli</i> Glutamyl-tRNA Reduktase .....</b>                              | <b>56</b> |
| 3.1.1      | Rekombinante Produktion und chromatographische Reinigung der <i>Escherichia coli</i> Glutamyl-tRNA Synthetase .....   | 58        |
| 3.1.2      | Rekombinante Produktion und chromatographische Reinigung der <i>Escherichia coli</i> Glutaminyl-tRNA Synthetase ..... | 60        |
| 3.1.3      | Rekombinante Produktion und Reinigung der <i>Escherichia coli</i> Glutamat-1-semialdehyd-2,1-Aminomutase .....        | 61        |
| 3.1.4      | Rekombinante Produktion, Renaturierung und Reinigung der Glutamyl-tRNA Reduktase aus <i>Escherichia coli</i> .....    | 62        |
| 3.1.5      | Glutamyl-tRNA Reduktase Aktivitätstest (Depletionstest).....                                                          | 65        |
| 3.1.6      | Darstellung der Reaktionsprodukte des C <sub>5</sub> -Synthesewegs mittels HPLC.....                                  | 66        |
| 3.1.7      | Herstellung der misacylierten [ <sup>14</sup> C]Gln-tRNA <sup>Glu</sup> .....                                         | 67        |
| 3.1.8      | Misacylierte Gln-tRNA <sup>Glu</sup> ist ein Substrat für die <i>Escherichia coli</i> Glutamyl-tRNA Reduktase .....   | 69        |



|            |                                                                                                                                                                                                            |            |
|------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 3.1.9      | Aktivitätstest der Glutamyl-tRNA Reduktase-Mutanten des aktiven Zentrums.....                                                                                                                              | 70         |
| 3.1.10     | Strukturelle Flexibilität der Glutamat-Erkennungstasche.....                                                                                                                                               | 72         |
| 3.1.11     | Versuche zur Veränderung der Substratspezifität der Glutamyl-tRNA Reduktase .....                                                                                                                          | 73         |
| 3.1.12     | Komplementation des <i>Escherichia coli hemA<sup>-</sup></i> Stamms GE1387 durch verschiedene <i>hemA</i> Mutanten, die Aminosäureaustausche im aktiven Zentrum der Glutamyl-tRNA Reduktase kodieren ..... | 74         |
| <b>3.2</b> | <b>Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus der <i>Escherichia coli</i> Glutamyl-tRNA Reduktase</b> .....                                                                                                   | <b>76</b>  |
| 3.2.1      | Die Funktion von Glutamin 116 während des Hydridtransfers von NADPH .....                                                                                                                                  | 76         |
| 3.2.2      | Bestimmung der Glutamyl-tRNA Reduktase Esterase-Aktivität mittels 4-Nitrophenylacetat.....                                                                                                                 | 77         |
| <b>3.3</b> | <b>Charakterisierung des GluTR/GSA-AM Komplexes</b> .....                                                                                                                                                  | <b>80</b>  |
| 3.3.1      | <i>In vivo</i> Co-Immunopräzipitation.....                                                                                                                                                                 | 82         |
| 3.3.1.1    | Die Komplexbildung ist abhängig von der Wachstumsphase .....                                                                                                                                               | 83         |
| 3.3.1.2    | In dem <i>hemA<sup>-</sup></i> -Stamm EV61 ist kein Komplex nachweisbar.....                                                                                                                               | 83         |
| 3.3.2      | <i>In vitro</i> Co-Immunopräzipitation.....                                                                                                                                                                | 84         |
| 3.3.2.1    | Die Komplexbildung ist Temperatur tolerant.....                                                                                                                                                            | 84         |
| 3.3.2.2    | Die Bedeutung des Substrats und der Cofaktoren für die Komplexbildung .....                                                                                                                                | 84         |
| 3.3.2.3    | Die Komplexbildung wird durch die Dimerisierung der Glutamyl-tRNA Reduktase unterstützt .....                                                                                                              | 85         |
| 3.3.3      | Identifizierung weiterer Protein-Interaktionspartner der Glutamyl-tRNA Reduktase .....                                                                                                                     | 86         |
| 3.3.4      | Bestimmung der Bindungskonstante mittels Hummel/Dreyer für den GluTR/GSA-AM Komplex .....                                                                                                                  | 87         |
| 3.3.5      | „Metabolic channeling“-Funktion des GluTR/GSA-AM Komplexes....                                                                                                                                             | 90         |
| 3.3.6      | Der GluTR/GSA-AM Komplex in <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....                                                                                                                                         | 92         |
| <b>4</b>   | <b>Zusammenfassung</b> .....                                                                                                                                                                               | <b>93</b>  |
| <b>5</b>   | <b>Ausblick</b> .....                                                                                                                                                                                      | <b>94</b>  |
| <b>6</b>   | <b>Literaturverzeichnis</b> .....                                                                                                                                                                          | <b>95</b>  |
|            | <b>Danksagung</b> .....                                                                                                                                                                                    | <b>104</b> |

## Abkürzungen und Glossar

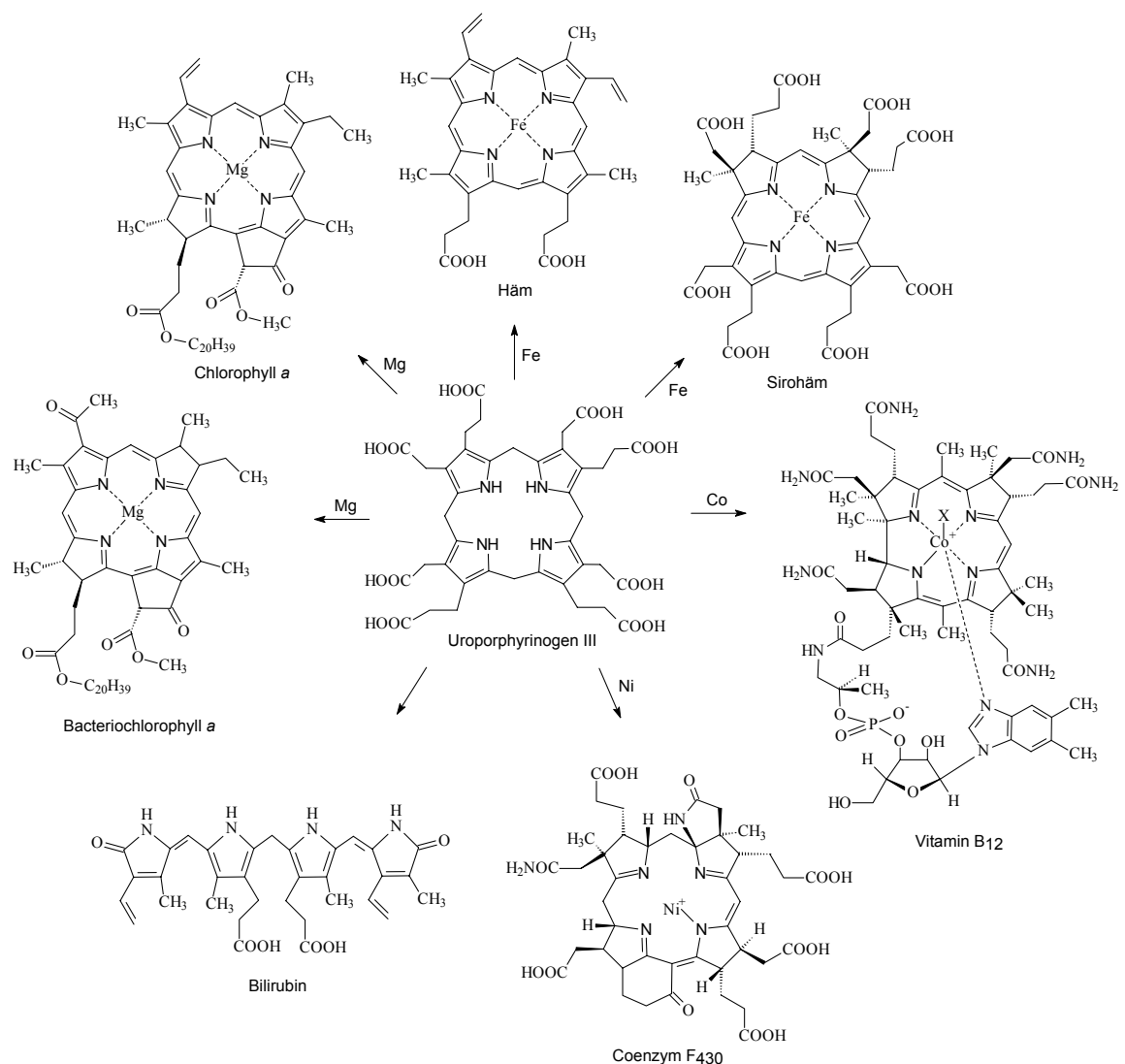
|                |                                                                                        |
|----------------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| $A_{Xnm}$      | Relative Absorption bei einer Wellenlänge von X nm                                     |
| ALA            | 5-Aminolävulinsäure                                                                    |
| ALAS           | ALA-Synthase                                                                           |
| APB            | Alkalischer Phosphatase Puffer                                                         |
| APS            | Ammoniumperoxodisulfat                                                                 |
| ATP            | Adenosintriphosphat                                                                    |
| BCIP           | 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat                                                       |
| bp             | Basenpaare                                                                             |
| BSA            | Rinderserumalbumin („bovine serum albumin“)                                            |
| °C             | Grad Celsius                                                                           |
| c              | Proteinkonzentration                                                                   |
| CD             | Zirkulärer Dichroismus („circular dichroism“)                                          |
| CHAPS          | 3-[(3-Cholamidopropyl)-Dimethylammonio]-Propansulfat                                   |
| CoA            | Coenzym A                                                                              |
| CPO            | Coproporphyrinogen III Oxidase                                                         |
| d              | Schichtdicke der Küvette                                                               |
| Da             | Dalton                                                                                 |
| DAVA           | 4,5-Diaminovalerinsäure                                                                |
| ddNTP          | Didesoxyribonukleotidtriphosphat                                                       |
| Depletionstest | Aktivitätstest, bei dem die Abnahme des Substrats verfolgt wird                        |
| dest.          | Destilliert                                                                            |
| DMF            | Dimethylformamid                                                                       |
| DNA            | Desoxyribonukleinsäure („desoxyribonucleic acid“)                                      |
| dNTP           | Desoxyribonukleotidtriphosphat                                                         |
| DOVA           | 4,5-Dioxovalerat                                                                       |
| dpm            | Zerfälle pro Minute („desintegrations per minute“)                                     |
| ds             | Doppelsträngig                                                                         |
| DTT            | 1,4-Dithio-D,L-threitol                                                                |
| $\epsilon$     | Molarer Extinktionskoeffizient                                                         |
| EDTA           | Ethylendiamintetraessigsäure                                                           |
| EF-Tu          | Elongationsfaktor-Tu                                                                   |
| FPLC           | Schnelle Protein-Flüssigkeitschromatographie<br>(„fast protein liquid chromatography“) |

|                         |                                                                                         |
|-------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| GlnRS                   | Glutaminyl-tRNA Synthetase                                                              |
| GluRS                   | Glutamyl-tRNA Synthetase                                                                |
| GluTR                   | Glutamyl-tRNA Reduktase                                                                 |
| Glu-tRNA <sup>Glu</sup> | Glutamyl-tRNA <sup>Glu</sup>                                                            |
| Gln-tRNA <sup>Glu</sup> | Glutaminyl-tRNA <sup>Glu</sup>                                                          |
| GPC                     | Gelpermeationschromatographie                                                           |
| GSA                     | Glutamat-1-semialdehyd                                                                  |
| GSA-AM                  | Glutamat-1-semialdehyd-2,1-Aminomutase                                                  |
| h                       | Stunde                                                                                  |
| HEPES                   | 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperanzinyl]-ethansulfonsäure                                  |
| His <sub>6</sub> -Tag   | Polyhistidin-Sequenz von 6 Aminosäuren Länge                                            |
| HPLC                    | Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie<br>(„high performance liquid chromatography“) |
| IgG                     | Immunglobulin G                                                                         |
| inclusion bodies        | Einschlusskörper                                                                        |
| IPTG                    | Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid                                                      |
| l                       | Liter                                                                                   |
| LB                      | Luria Bertani (Medium)                                                                  |
| M                       | Molar                                                                                   |
| M <sub>r</sub>          | Relative molekulare Masse                                                               |
| min                     | Minute                                                                                  |
| NADPH                   | Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduziert)                                        |
| NBT                     | Nitroblau-Tetrazoliumchlorid                                                            |
| n                       | Anzahl                                                                                  |
| n.m.                    | Nicht messbar                                                                           |
| OD <sub>Xnm</sub>       | optische Dichte bei einer Wellenlänge von X nm                                          |
| PAGE                    | Polyacrylamidgelelektrophorese                                                          |
| PBS                     | phosphatgepufferte Salzlösung („phosphate buffered saline“)                             |
| PBGs                    | Porphobilinogensynthase                                                                 |
| PCI                     | Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol                                                        |
| PCR                     | Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“)                                 |
| pH                      | Negativer dekadischer Logarithmus der H <sup>+</sup> -Konzentration einer Lösung        |
| PIPES                   | Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure)                                                  |

|                     |                                                  |
|---------------------|--------------------------------------------------|
| PLP                 | Pyridoxal-5'-phosphat                            |
| PMP                 | Pyridoxamin-5'-phosphat                          |
| PVDF                | Polyvinylidendifluorid                           |
| RNA                 | Ribonukleinsäure („ribonucleic acid“)            |
| RNase               | Ribonuklease                                     |
| rpm                 | Umdrehung pro Minute („rounds per minute“)       |
| RT                  | Raumtemperatur                                   |
| SAM                 | S-Adenosylmethionin                              |
| SDS                 | Natriumdodecylsulfat                             |
| sec                 | Sekunde                                          |
| TCA                 | Trichloressigsäure                               |
| TEMED               | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin               |
| Tris                | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan                 |
| Triton-X100         | t-Octylphenoxypolyethoxyethanol                  |
| tRNA <sup>Glu</sup> | Glutamat-spezifische Transfer-RNA                |
| Tween               | Polyoxyethylensorbitanmonolaurat                 |
| UV                  | Ultraviolett                                     |
| V                   | Volt                                             |
| V <sub>0</sub>      | Ausschlussvolumen                                |
| V <sub>t</sub>      | Säulenvolumen                                    |
| v/v                 | Volumenanteil pro Volumen („volume per volume“)  |
| w/v                 | Gewichtsanteil pro Volumen („weight per volume“) |
| wt                  | Wildtyp                                          |



zwei Klassen unterteilt werden (Frankenberg *et al.*, 2003): die Porphyrine und die Porphinoide. Zu den Porphyrinen mit ihrem vollständig gesättigten Ringsystem gehören neben Häm auch die Chlorophylle und Bakteriochlorophylle. Die Porphinoide, wie Sirohäm, Coenzym F<sub>430</sub>, Häm *d*<sub>1</sub> sowie die Corrinoide weisen hingegen ein stärker reduziertes Grundgerüst auf. Den Corrinoiden, wie Vitamin B<sub>12</sub>, fehlt eine Methinbrücke im Porphyrinring (Friedmann & Thauer, 1992; Martens *et al.*, 2002). Durch Spaltung des zyklischen Grundgerüsts entstehen die offenkettigen Tetrapyrrole wie Biline und Phycobiline. Die Strukturen wichtiger Vertreter einiger Tetrapyrrolklassen sind in Abbildung 2 gezeigt.



**Abbildung 2:** Strukturen von wichtigen Vertretern verschiedener Tetrapyrrolklassen mit ihrem gemeinsamen Vorläufermolekül Uroporphyrinogen III.

Unter den Mitgliedern der Tetrapyrrolfamilie zeichnen sich besonders die eisenhaltigen Häme durch ihre Beteiligung an einer Vielzahl von verschiedenen biologischen Prozessen aus. Zum einen sind sie als Cofaktor im Hämoglobin für den Transport von molekularem Sauerstoff verantwortlich. Zum anderen kommen sie als prosthetische Gruppen in verschiedenen Proteinen vor, wie z. B. der Katalase, die das Zellgift Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff umwandelt (Chelikani *et al.*, 2003). Weiterhin besitzt Häm eine essentielle Funktion während der Atmung. Hier vermitteln Cytochrome mit Häm als prosthetischer Gruppe den Elektronentransfer zum Sauerstoff oder, bei der anaeroben Atmung bestimmter Prokaryoten, auch zu alternativen Elektronenakzeptoren, wie z. B. Nitrat oder Sulfat (Cole *et al.*, 1980). Als Regulatormolekül ist Häm sowohl auf Ebene der Transkription und der Translation als auch auf Ebene der Proteinstabilität involviert (Panek & O'Brian, 2002).

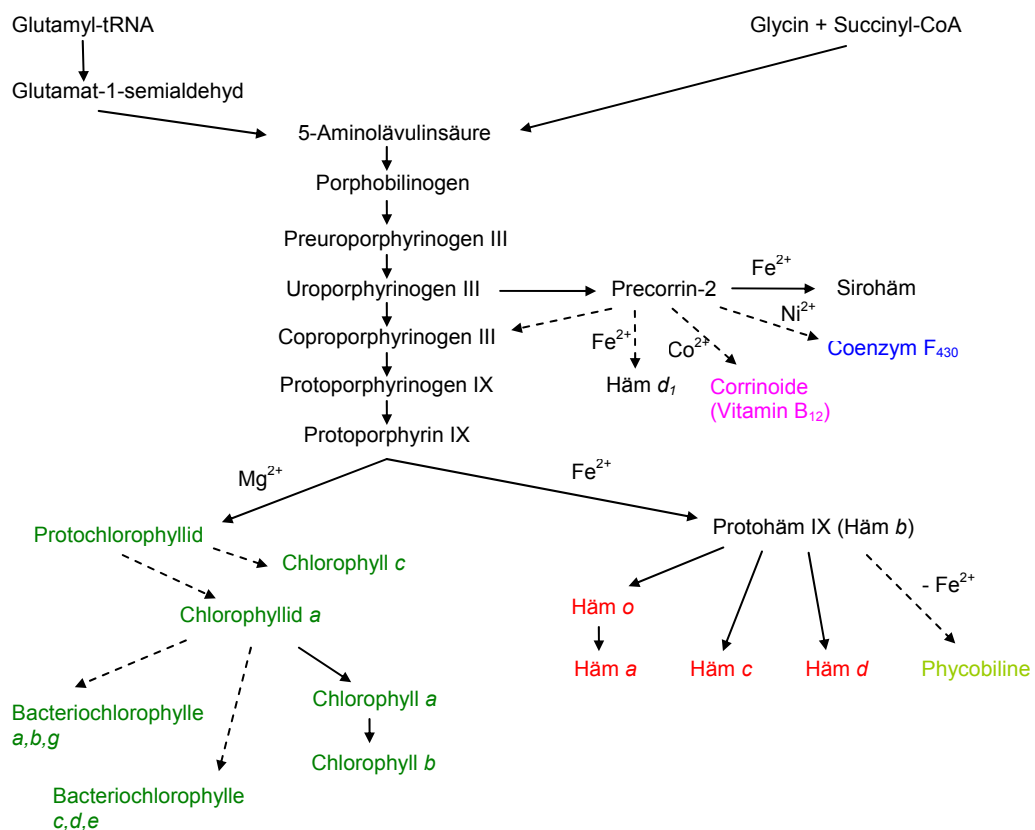
In Pflanzen und Bakterien stellen die grünen, Magnesium enthaltenden Chlorophylle die Schlüsselpigmente der Photosynthese dar. Dies ist der zentrale biologische Prozess, in dem Lichtenergie in chemische Energie umgewandelt werden kann, und der das Leben auf der Erde, wie wir es kennen, erst ermöglicht hat.

Coenzym F<sub>430</sub> besitzt Nickel als Zentralatom, weist eine gelbe Farbe auf und findet sich als prosthetische Gruppe der Methyl-Coenzym M Reduktase, die in Archaea an der Methanbildung beteiligt ist (Thauer & Bonacker, 1994). Die Cobalt enthaltenden Vitamin B<sub>12</sub> Derivate zählen zu den komplexesten Vertretern der Tetrapyrrole. Man findet sie in Enzymen wie der Homocystein-Methyltransferase, die Radikal-abhängige Reaktionen (z. B. Nukleotid-Reduktion und Methyl-Transfer) katalysieren (Banerjee, 2003). Während der assimilatorischen Nitrit oder Sulfit Reduktion wird der gelb-grüne, Eisen komplexierende Cofaktor Sirohäm benötigt (Raux *et al.*, 2003). Lineare Tetrapyrrole fungieren als Chromophore von Photorezeptoren und als Lichtsammelpigmente.

### 1.1.2 Überblick über die Tetrapyrrolbiosynthese

Das für die Tetrapyrrole charakteristische Grundgerüst impliziert einen gemeinsamen Biosyntheseweg. In der Tat werden alle Tetrapyrrole zunächst ausgehend von 5-Aminolävulinsäure (ALA) bis zu Uroporphyrinogen III über den gleichen Weg synthetisiert. Für die Biosynthese vom allgemeinen Vorläufermolekül ALA existieren allerdings zwei alternative Synthesewege: der Shemin- und der C<sub>5</sub>-Syntheseweg,

welche im Abschnitt 1.2 näher erläutert werden. Nach Entstehung des ersten makrozyklischen Tetrapyrrols Uroporphyrinogen III trennen sich die Biosynthesewege der verschiedenen Tetrapyrrole. Uroporphyrinogen III kann entweder zu Protoporphyrin IX oder zu Precorrin-2 umgewandelt werden. Precorrin-2 dient als Vorläufermolekül für Sirohäm, Häm  $d_1$ , Coenzym  $F_{430}$  und den Corrinoide. Protoporphyrin IX hingegen repräsentiert einen zweiten sehr wichtigen Verzweigungspunkt der Tetrapyrrolbiosynthese. Durch Insertion von  $Mg^{2+}$  verläuft die Biosynthese in Richtung der Chlorophylle bzw. der Bakteriochlorophylle und durch Insertion von  $Fe^{2+}$  in Richtung der Häme. Ein Überblick über die verschiedenen Biosynthesewege ist in Abbildung 3 dargestellt. Nur Prokaryoten können jedoch alle verschiedenen Klassen der Tetrapyrrole herstellen. In Eukaryoten ist die Tetrapyrrolbiosynthese limitiert auf die Bildung von Häm, Chlorophyll und Sirohäm.



**Abbildung 3:** Überblick über die verschiedenen Biosynthesewege natürlicher Tetrapyrrole. Unterbrochene Pfeile stellen Synthesewege dar, die hier nicht vollständig abgebildet oder noch nicht komplett aufgeklärt wurden (modifiziert von Jahn *et al.*, 1996).



### 1.1.3 Biosynthese der Tetrapyrrole ausgehend von 5-Aminolävulinsäure

Insgesamt acht Moleküle ALA liefern alle Kohlenstoff- und Stickstoffatome, die zur Bildung des Tetrapyrrolgrundgerüsts benötigt werden. Dabei werden zunächst zwei ALA-Moleküle durch die Porphobilinogensynthase (PBGS, auch ALA-Dehydratase) asymmetrisch zu dem Pyrrolderivat Porphobilinogen kondensiert. PBGS Enzyme aus verschiedenen Organismen zeichnen sich durch ihre unterschiedliche Metallabhängigkeit aus, wobei je nach Organismus Zink und/oder Magnesium für die Katalyse benötigt werden (Frère *et al.*, 2005). Die meisten PBGS-Kristallstrukturen (z. B. aus Hefe, *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa*) zeigen eine oktamere Oligomerisierung des Enzyms (Erskine *et al.*, 1997; Erskine *et al.*, 1999; Frankenberg *et al.*, 1999). Für die humane PBGS hingegen konnte neben dem hoch aktiven oktameren Enzym auch ein weniger aktives hexameres Enzym kristallisiert werden (Breinig *et al.*, 2003; Tang *et al.*, 2006).

Vier Moleküle Porphobilinogen werden im folgenden Schritt zu dem linearen Tetrapyrrol Prä-Uroporphyrinogen zusammengefügt (Jordan, 1994). Katalysiert wird diese Reaktion, bei der vier Moleküle  $\text{NH}_3$  freigesetzt werden, durch die Porphobilinogen Desaminase. Dieses Enzym besitzt einen ungewöhnlichen Cofaktor aus zwei Porphobilinogen Molekülen (Dipyrromethan), der über einen Thioester kovalent an das Enzym gebunden ist. Dipyrromethan dient während der Reaktion als Ausgangspunkt für die Tetramerisierung von Porphobilinogen, ohne jedoch dabei selbst ins Produkt integriert zu werden. Prä-Uroporphyrinogen wird anschließend direkt zur Uroporphyrinogen III Synthase weitergeleitet, um eine spontane Autozyklisierung zum toxischen Uroporphyrinogen I zu verhindern. Die Uroporphyrinogen III Synthase katalysiert die Zyklisierung von Prä-Uroporphyrinogen zu Uroporphyrinogen III unter Inversion des Rings D. Die Asymmetrie des entstehenden Uroporphyrinogen III ist eine wichtige Voraussetzung für die richtige Erkennung des Moleküls durch die folgenden Enzyme.

#### 1.1.3.1 Die Biosynthese von Sirohäm, Coenzym $\text{F}_{430}$ , Corrinoïden und Häm $d_1$ ausgehend von Precorrin-2

Durch eine S-Adenosylmethionin (SAM)-abhängige Methylierung an zwei Positionen wird zunächst Uroporphyrinogen III zu Precorrin-2 (Dihydrosirohydrochlorin)

umgewandelt, welches die Vorstufe aller in diesem Abschnitt beschriebenen Tetrapyrrole darstellt. Die Bildung von Sirohäm verläuft über eine Oxidation zu Sirohydrochlorin und die anschließende Eiseninsertion. Für die Bildung von Coenzym F<sub>430</sub> werden hingegen folgende fünf Schritte benötigt: (i) die Insertion von Nickel, (ii) die Amidation der Acetatgruppen der Ringe A und B, (iii) die Reduzierung zweier Doppelbindungen, (iv) die Zyklisierung der Acetamide von Ring B und (v) die Zyklisierung der Propionatgruppen von Ring D (Thauer & Bonacker, 1994). Zur Biosynthese von Vitamin B<sub>12</sub> existieren zwei verschiedene Wege: ein Sauerstoff-abhängiger und ein Sauerstoff-unabhängiger Weg; wobei der größte Unterschied dabei im unterschiedlichen Zeitpunkt der Cobaltinsertion liegt. Im Gegensatz zu den Hämen *a*, *b* und *c*, die ausgehend von Protoporphyrin IX gebildet werden, wird Häm *d*<sub>1</sub> ausgehend von Preccorin-2 gebildet.

### 1.1.3.2 Die Biosynthese von Häm und Chlorophyll

Zur Biosynthese von Häm- und Chlorophyllmolekülen werden zunächst vier Acetatreste des Uroporphyrinogen III schrittweise zu Methylgruppen decarboxyliert. Die Uroporphyrinogen III Decarboxylase beginnt diese Reaktion am Ring D und setzt sie an Ring A, B und C im Uhrzeigersinn fort. Anschließend wird das so gebildete Coproporphyrinogen III durch oxidative Decarboxylierung zu Protoporphyrinogen IX umgesetzt. Diese Reaktion kann durch unterschiedliche Typen von Coproporphyrinogen III Oxidasen (CPO) katalysiert werden. Zum einen werden die Propionatgruppen an den Ringen A und B von der Sauerstoff-abhängigen Coproporphyrinogen III Oxidase (HemF) zu den entsprechenden Vinylgruppen decarboxyliert, wobei die Elektronen auf molekularen Sauerstoff übertragen werden. Die direkte Bindung von Metallionen an das Enzym wurde bisher kontrovers diskutiert. So zeigte die CPO-Struktur aus Hefe keinerlei gebundenes Metall. In biochemischen und spektroskopischen Untersuchungen konnte jedoch eine Bindung von Manganionen an das Enzym aus *E. coli* nachgewiesen werden (Breckau *et al.*, 2003).

Zum anderen kann diese Decarboxylierung auch unter anaeroben Bedingungen ablaufen. In diesem Fall ist das katalysierende Enzym die Sauerstoff-unabhängige Coproporphyrinogen III Oxidase (HemN), die die Elektronen auf einen noch unbekannten Akzeptor überträgt. Die Struktur von HemN konnte kürzlich in unserer Arbeitsgruppe gelöst werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das Enzym einen

ungewöhnlichen radikalischen Mechanismus für diese SAM-abhängige Reaktion besitzt (Layer *et al.*, 2003; Layer *et al.*, 2006).

Aus Protoporphyrinogen IX entsteht in einer 6-Elektronen-Oxidation, katalysiert durch die Protoporphyrinogen IX Oxidase, das letzte gemeinsame Vorläufermolekül der Häm- und Chlorophylle, Protoporphyrin IX. Durch Insertion von Eisen, katalysiert durch die Ferrochelatase, wird Protohäm IX gebildet, von dem sich alle anderen Häm- ableiten. Mit der Komplexbildung von  $Mg^{2+}$  durch die Magnesiumchelatase beginnt die Synthese der Chlorophylle und Bakteriochlorophylle.

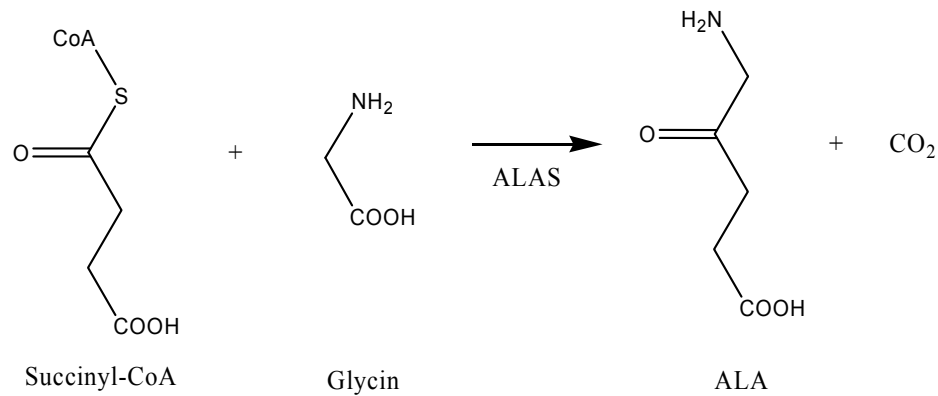
## 1.2 Synthesewege der 5-Aminolävulinsäure

Für die Biosynthese des allgemeinen Vorläufermoleküls aller Tetrapyrrole, ALA, existieren in der Natur zwei alternative Wege. Bis heute sind nur einige wenige Organismen bekannt, bei denen beide Synthesewege parallel vorkommen, wie z. B. *Euglena gracilis* und *Streptomyces nodosus* (Weinstein & Beale, 1983; Petříček *et al.*, 2006).

### 1.2.1 Der Shemin-Syntheseweg

Der schon seit den 50er Jahren bekannte Syntheseweg wurde von seinem Namensgeber David Shemin entdeckt (Abbildung 4). Er demonstrierte in einem Selbstexperiment zunächst den Einbau von  $[^{15}N]$ Glycin in das Häm des Hämoglobins (Shemin & Rittenberg, 1945). Später konnte er zeigen, dass aus Glycin und Succinyl-Coenzym A (Succinyl-CoA) das für alle Tetrapyrrole universelle Vorläufermolekül ALA gebildet wird (Shemin & Russel, 1953).

Die Kondensierung von Glycin und Succinyl-CoA zu ALA erfolgt unter  $CO_2$ -Freisetzung durch die Pyridoxal-5'-phosphat (PLP)-abhängige ALA-Synthase (ALAS) (Gibson *et al.*, 1958; Kikuchi *et al.*, 1958). Die Struktur der ALAS aus *Rhodobacter capsulatus* konnte erst kürzlich gelöst werden (Astner *et al.*, 2005). Lange Zeit galt der Shemin-Syntheseweg als ubiquitär für alle Organismen, doch heute ist bekannt, dass er nur in den Mitochondrien von nicht photosynthetisch aktiven Eukaryoten, wie Menschen und Tieren, den Pilzen und den  $\alpha$ -Proteobakterien zu finden ist.



**Abbildung 4: Shemin-Syntheseweg zur Bildung von 5-Aminolävulinsäure.**

Die Biosynthese von ALA bei Menschen, Tieren, Pilzen und den  $\alpha$ -Proteobakterien erfolgt durch Kondensation von Glycin und Succinyl-Coenzym A durch die ALA-Synthase (ALAS).

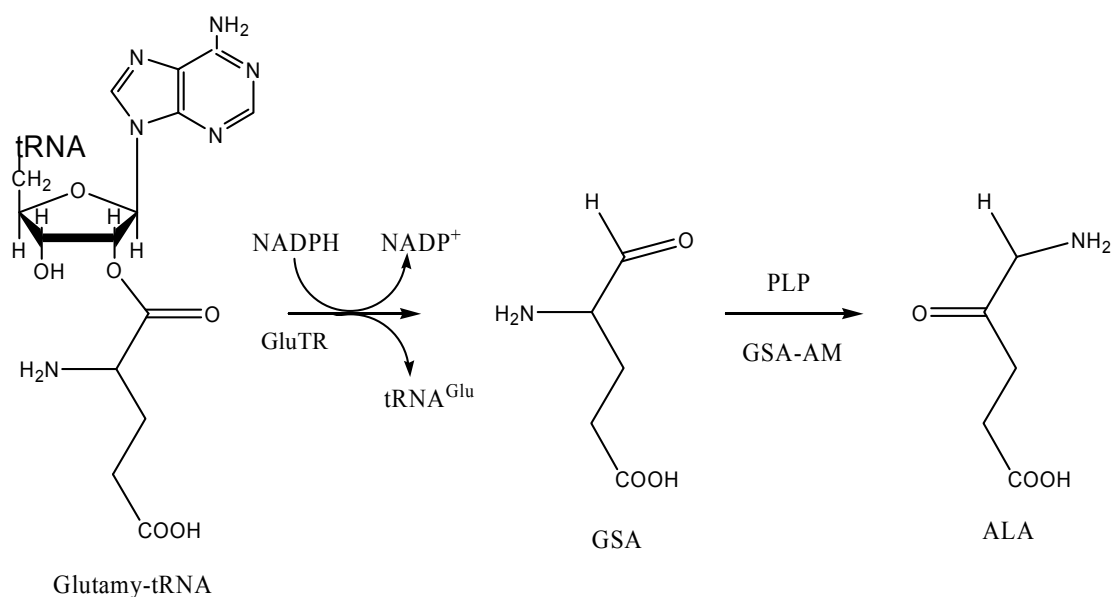
### 1.2.2 Der C<sub>5</sub>-Syntheseweg

In den siebziger Jahren wurde in Pflanzen ein alternativer Weg zur Bildung von ALA gefunden (Abbildung 5). Bei Versuchen mit [<sup>14</sup>C] markiertem Glutamat wurde festgestellt, dass in Gerste das Kohlenstoffgrundgerüst des Glutamats vollständig zu ALA umgewandelt wird (Beale *et al.*, 1975). Etwa zehn Jahre später erlangte dieser Biosyntheseweg erneut große Aufmerksamkeit, da die Beteiligung der tRNA<sup>Glu</sup> an der ALA-Bildung entdeckt wurde (Kannangara *et al.*, 1984; Weinstein & Beale, 1985; Huang & Wang, 1986). Bei der mit Glutamat acylierten tRNA<sup>Glu</sup> handelt es sich um die gleiche Glu-tRNA<sup>Glu</sup>, die auch für die Proteinbiosynthese genutzt wird (Jahn *et al.*, 1992). Als erstes Enzym des C<sub>5</sub>-Synthesewegs katalysiert die Glutamyl-tRNA Reduktase (GluTR) in einer NADPH-abhängigen Reaktion die Umsetzung von Glu-tRNA<sup>Glu</sup> zu Glutamat-1-semialdehyd (GSA), wobei tRNA<sup>Glu</sup> frei wird (Jahn *et al.*, 1991a). Im folgenden Schritt wird GSA durch eine Transaminierung der Glutamat-1-semialdehyd-2,1-Aminomutase (GSA-AM) zu ALA umgewandelt (Ilag & Jahn, 1992; Jahn *et al.*, 1991b). Der tRNA-abhängige ALA-Biosyntheseweg wird von Pflanzen, Archaea und den meisten Bakterien (mit Ausnahme der  $\alpha$ -Proteobakterien, siehe 1.2.1) genutzt. Da Menschen und Tiere den Shemin-Syntheseweg zur Bildung von ALA verwenden, bietet der C<sub>5</sub>-Syntheseweg gute Ansatzmöglichkeiten zur Entwicklung von Herbiziden und Antibiotika, die nicht toxisch für Menschen und Tiere sind.

Obwohl der C<sub>5</sub>-Syntheseweg erst später entdeckt wurde, gilt er aufgrund der Beteiligung der tRNA<sup>Glu</sup>, einem Überrest der so genannten „RNA Welt“ (Gilbert,

1986), als der evolutionär ältere Weg der ALA-Synthese (Woese, 1987; Avissar & Beale, 1989).

Zu einer Überraschung kam es, als 2005 die Struktur der ALAS gelöst werden konnte (Astner *et al.*, 2005). Die ALAS zeigt eine große strukturelle Verwandtschaft zur GSA-AM, obwohl beide Enzyme nur eine Sequenzidentität von 18 % besitzen. Da beide Enzyme das Reaktionsprodukt ALA synthetisieren wurde vermutet, dass eine evolutionäre Verbindung zwischen der ALAS und der GSA-AM besteht. Es wurde postuliert, dass sich die ALAS aus der GSA-AM entwickelt hat, da der C<sub>5</sub>-Syntheseweg den älteren der beiden Wege darstellt (Schulze *et al.*, 2006).



**Abbildung 5:** C<sub>5</sub>-Syntheseweg zur Bildung von 5-Aminolävulinsäure. Die GluTR reduziert mittels NADPH Glutamyl-tRNA unter Freisetzung von tRNA<sup>Glu</sup> zu GSA. GSA wird PLP-abhängig von der GSA-AM zu ALA umgewandelt.

### 1.2.3 Regulation der ALA-Synthese

Viele Zwischenprodukte der Tetrapyrrolbiosynthese werden leicht durch Licht angeregt, was zur Bildung von toxischen Radikalen und von hoch reaktiven Singulett-Sauerstoff Spezies führen kann (Vavilin & Vermaas, 2002). Um die Anhäufung der Zwischenprodukte in der Zelle zu vermeiden und gleichzeitig die ausreichende Versorgung der Zelle mit den Endprodukten der Tetrapyrrolbiosynthese sicherzustellen, unterliegt die Tetrapyrrolbiosynthese in allen Organismen einer strikten Regulation. Als wichtigster Kontrollpunkt dieser Regulation gilt die ALA-Bildung (Schobert & Jahn, 2002). Vor allen in Pflanzen, aber auch in verschiedenen Bakterien, wie *P. aeruginosa*,

*E. coli* und *Bacillus subtilis* wurde diese Regulation detailliert untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass die ALA-Bildung meist den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Tetrapyrrolbiosynthese darstellt.

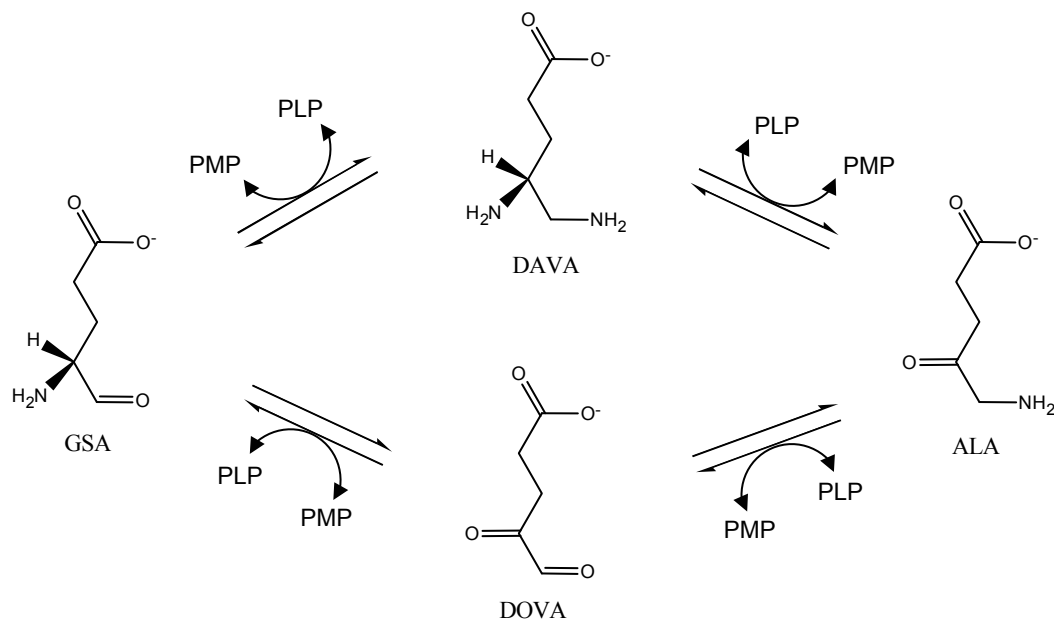
Zentraler Angriffspunkt hierbei ist in Pflanzen, Archaea und den meisten Bakterien die GluTR. Die Regulation kann dabei durch unterschiedliche Faktoren auf vielen verschiedenen Ebenen, wie der Transkription, der Translation oder der Proteinstabilität erfolgen. In Gerste scheinen die mRNA- und die Proteinmenge der GluTR abhängig vom Tageszyklus zu sein. Dabei besteht eine hohe Korrelation zwischen der mRNA- und der Proteinmenge, welches auf eine hohe „turnover“-Rate für die GluTR schließen lässt. Die beiden Proteasen Lon und ClpPA kontrollieren den Häm-abhängigen Umsatz der GluTR in *Salmonella typhimurium* (Wang *et al.*, 1999). Für verschiedene pflanzliche GluTRs wurde in *in vitro* Versuchen eine direkte „feedback“-Inhibierung durch Häm gezeigt. Diese Inhibierung kann jedoch nicht als allgemein gültig für alle GluTRs angesehen werden. Der ca. 30 Aminosäuren umfassende N-terminale Bereich der GluTR, der für die regulatorische Häm-Bindung verantwortlich zu sein scheint (Vothknecht *et al.*, 1998), ist in den bakteriellen Enzymen nicht zu finden. Hier scheint die Regulation durch Häm über zusätzliche noch unbekannte Mechanismen vermittelt zu werden. Häm ist jedoch *in vitro* in  $\mu\text{M}$ -Konzentrationen bereits in der Lage, auch unspezifisch andere Enzyme zu inhibieren, so dass die physiologische Bedeutung der Häm-Inhibierung der GluTR zum Teil kontrovers diskutiert wird.

## 1.3 Die Komponenten des C<sub>5</sub>-Synthesewegs

### 1.3.1 Die Glutamat-1-semialdehyd-2,1-Aminomutase

Im zweiten Schritt der tRNA-abhängigen ALA-Biosynthese wird GSA durch den intramolekularen Austausch der Amino- und der Aldehydfunktion in ALA umgewandelt. Katalysiert wird diese Reaktion durch die GSA-AM (Hoover *et al.*, 1988; Ilag & Jahn, 1992). Die GSA-AM ist ein Homodimer und gehört zur  $\alpha$ -Familie der PLP-abhängigen Enzyme (Mehta & Christen, 2000). Obwohl die GSA-AM den Austausch der Amino- und der Oxo-Gruppe innerhalb eines Moleküls katalysiert, besitzt sie strukturelle und mechanistische Homologien zu den Aminotransferasen (Henning *et al.*, 1997; Ilag & Jahn, 1992; Smith *et al.*, 1991; Pugh *et al.*, 1992).

Für die durch die GSA-AM katalysierte Reaktion werden zwei mögliche Mechanismen diskutiert (Schulze *et al.*, 2006). Zum einen kann die Umwandlung von GSA zu ALA über das Zwischenprodukt 4,5-Diaminovalerinsäure (DAVA) verlaufen (Smith *et al.*, 1991; Pugh *et al.*, 1992). Dabei wird während der ersten Hälfte der Reaktion der Cofaktor Pyridoxamin-5'-phosphat (PMP) zu PLP umgewandelt und anschließend wieder regeneriert. Der alternative Reaktionsmechanismus startet mit der PLP-gebundenen Form des Enzyms (Ilag & Jahn, 1992). Als Zwischenprodukt wird 4,5-Dioxovalerat (DOVA) und PMP gebildet. Durch die abschließende ALA-Bildung entsteht wieder PLP (Abbildung 6).



**Abbildung 6:** Die Umwandlung von Glutamat-1-semialdehyd zu 5-Aminolävulinsäure katalysiert durch die Glutamat-1-semialdehyd-2,1-Aminomutase.

Die Reaktion kann zum einen über das Zwischenprodukt 4,5-Diaminovalerinsäure (DAVA) verlaufen, wobei in der ersten Hälfte der Reaktion Pyridoxamin-5'-phosphat (PMP) zu Pyridoxal-5'-phosphat (PLP) umgewandelt wird und während der zweiten Reaktionshälfte wieder regeneriert wird. Der alternative Mechanismus verläuft über 4,5-Dioxovalerat (DOVA) und benötigt zunächst PLP.

Der Cofaktor in seiner PLP-Form wird als „internes Aldimin“ kovalent an ein katalytisch wichtiges Lysin gebunden. Alle bisher untersuchten GSA-AM Enzyme sind in der Lage, beide Teilreaktionen durchzuführen. Kinetischen Studien zufolge ist der erste beschriebene Mechanismus der wahrscheinlichere (Smith *et al.*, 1991; Pugh *et al.*, 1992). Die kürzlich gelöste GSA-AM Struktur aus *Thermosynechococcus elongatus* (GSA-AM<sub>Tel</sub>) (Schulze *et al.*, 2006) unterstützt hingegen den alternativen Reaktionsverlauf über das Zwischenprodukt DOVA. Somit bleibt der genaue Reaktionsverlauf weiterhin ungeklärt.

Neben der Struktur der GSA-AM aus *T. elongatus* wurde vor einigen Jahren auch die Kristallstruktur der GSA-AM aus *Synechococcus* sp. aufgeklärt (GSA-AM<sub>Syn</sub>) (Hennig *et al.*, 1997). Der Vergleich beider Strukturen ergab einige signifikante Unterschiede. Im Gegensatz zum asymmetrischen Homodimer der GSA-AM<sub>Syn</sub> ist die homodimere GSA-AM<sub>Tel</sub> völlig symmetrisch aufgebaut. Des Weiteren ist in beiden Monomeren der GSA-AM<sub>Tel</sub> PLP gebunden, wohingegen nur eine Untereinheit der GSA-AM<sub>Syn</sub> PLP enthält und die andere PMP. Der Öffnungswinkel der Monomere zu einander ist bei der GSA-AM<sub>Tel</sub> um 10° größer als bei der GSA-AM<sub>Syn</sub>.

### 1.3.2 Die Glutamat-spezifische tRNA

Die Glu-tRNA<sup>Glu</sup> nimmt eine Sonderstellung unter den tRNA-Molekülen ein. Sie dient sowohl in der Proteinbiosynthese als auch in der Tetrapyrrolobiosynthese als aktivierte Vorstufe. Beide Aufgaben werden dabei von der gleichen tRNA<sup>Glu</sup> erfüllt (Jahn *et al.*, 1992). Aufgrund ihrer dualen Funktion muss gewährleistet werden, dass der tRNA-Fluss zur Protein- als auch zu Tetrapyrrolobiosynthese entsprechend reguliert wird. Eine Voraussetzung hierfür ist die Erkennung der tRNA sowohl durch die Glutamyl-tRNA Synthetase (GluRS) als auch durch die GluTR. Für beide Enzyme konnten jeweils unterschiedliche Erkennungsmerkmale für die tRNA<sup>Glu</sup> charakterisiert werden (Randau *et al.*, 2004; Sekine *et al.*, 1996).

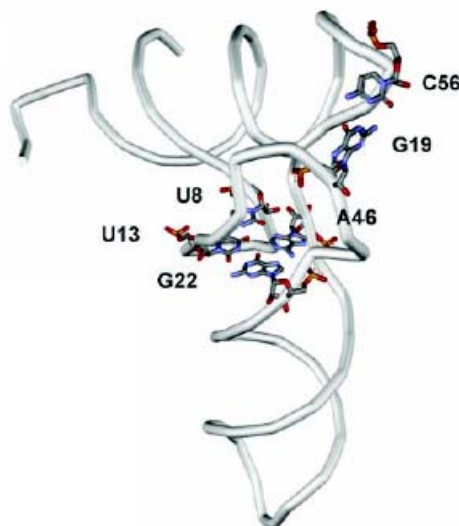
Zunächst wird die tRNA<sup>Glu</sup> durch die GluRS unter ATP-Verbrauch mit Glutamat acyliert. Der entstandene Aminosäureester ist daher eine hochenergetische Verbindung. Bei der Proteinbiosynthese wird dieses energiereiche Substrat dafür genutzt, um Aminosäuren an die wachsende Polypeptidkette anzufügen. Die Aminoacyl-tRNA Synthetasen sichern durch die Verknüpfung von tRNA mit der entsprechenden Aminosäure den fehlerfreien Ablauf der Proteinbiosynthese. Um die korrekte Verknüpfung von tRNA und Aminosäure zu gewährleisten, müssen die Synthetasen ihre spezifische tRNA erkennen. Weiterhin besitzen die meisten Synthetasen eine „Proofreading“ Funktion.

Die Identitätselemente der *E. coli* GluRS wurden 1996 mit Hilfe *in vitro* synthetisierter tRNA<sup>Glu</sup>-Varianten bestimmt (Sekine *et al.*, 1996). Dabei wurde beobachtet, dass die GluRS zu einer kleinen Gruppe von Synthetasen gehört, bei denen eine posttranskriptional modifizierte Base essentiell für die Erkennung der tRNA ist. Im Bereich des Anticodons liegt die Base U34 als 5-Methylaminomethyl-2-Thiouridin vor



(Sylvers *et al.*, 1993). Eine *in vitro* synthetisierte, unmodifizierte tRNA<sup>Glu</sup> hat einen um den Faktor 100 verringerten  $k_{cat}/K_M$ -Wert für die Acylierung durch die GluRS (Madore *et al.*, 1999). Neben dieser modifizierten Base gehören auch die anderen Basen des Anticodons, einige Basen im Akzeptorstamm und in der D-Schleife zu den Erkennungsmerkmalen der GluRS.

Für die GluTR hängt die Erkennung der tRNA<sup>Glu</sup> im Gegensatz zur GluRS nicht von posttranskriptionalen Modifikationen ab. Erste Hinweise für die Erkennungsmerkmale lieferte eine Chlorophyll defiziente *Euglena gracilis* Mutante. Die aus dieser Mutante isolierte tRNA<sup>Glu</sup> konnte zwar sowohl *in vivo* als auch *in vitro* mit Glutamat acyliert werden, allerdings konnte diese Glu-tRNA<sup>Glu</sup> nur schlecht von der GluTR als Substrat genutzt werden (Stange-Thomann *et al.*, 1994). Aus der Sequenzanalyse der tRNA<sup>Glu</sup> ging hervor, dass sie einen Basenaustausch von C zu U an Position 56 aufwies. Daraus wurde gefolgert, dass C56 ein Identitätselement für die GluTR darstellt. Kürzlich konnten weitere Identitätsmerkmale durch kinetische Studien von 51 unterschiedlichen tRNA Transkripten ermittelt werden. Dabei zeigte sich, dass die Base U8, das Basentriplet U13\*\*G22\*\*A46, das tertiäre Watson-Crick Basenpaar G19\*C56 und die Deletion der Base 47 für die Erkennung durch die GluTR essentiell sind (Abbildung 7).



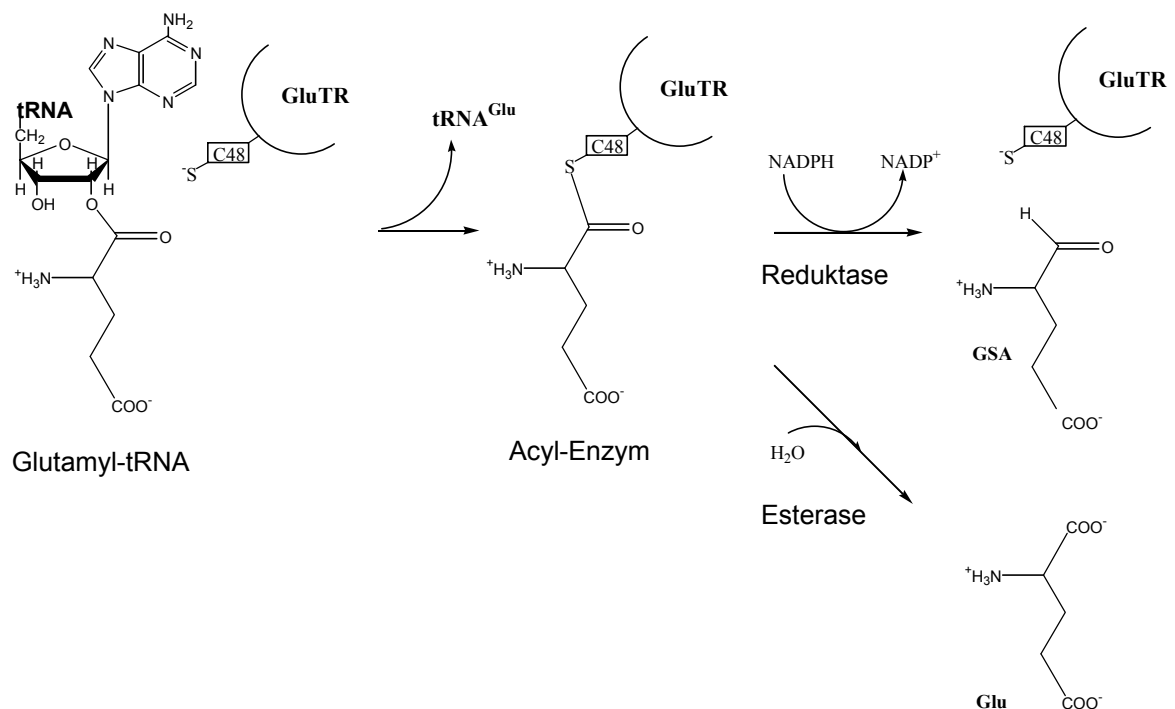
**Abbildung 7: Identitätsmerkmale für die Erkennung zwischen der tRNA<sup>Glu</sup> und der GluTR.**  
Gezeigt ist die dreidimensionale Struktur der tRNA<sup>Glu</sup>, bei der die für die Erkennung durch die GluTR wichtigen Basen hervorgehoben sind (aus Randau *et al.*, 2004).

Alle diese Basen tragen zur Bildung der einzigartigen tertiären Kernstruktur der tRNA<sup>Glu</sup> bei. Weiterhin konnte durch Footprinting-Experimente die physische Interaktion des tertiären Kerns der tRNA<sup>Glu</sup> mit der GluTR bestätigt werden. Die posttranskriptional modifizierte Base 34, die eine positive Determinante für die

Erkennung durch die GluRS darstellt, spielt für die Erkennung durch die GluTR keinerlei Rolle.

### 1.3.3 Die Glutamyl-tRNA Reduktase

Die genauere Untersuchung der GluTR erwies sich lange Zeit als schwierig, da das Enzym in der Zelle nur in sehr geringer Kopienzahl vorhanden ist und als rekombinant produziertes Enzym sehr instabil ist. Dementsprechend waren auch die resultierenden Ergebnisse bezüglich Molekulargewicht, Cofaktoren und Aktivitäten sehr widersprüchlich (Vothknecht *et al.*, 1996; Vothknecht *et al.*, 1998; Pontoppidan & Kannangara, 1994; Chen *et al.*, 1990; Jahn *et al.*, 1992). Erst im Jahre 1999 konnte mit Hilfe des rekombinant produzierten Enzyms aus dem thermophilen Archeon *Methanopyrus kandleri* ein Modell für den Enzymmechanismus erstellt werden (Moser *et al.*, 1999). Dieses Modell konnte in späteren biochemischen Studien mit dem Enzym aus *E. coli* verifiziert (Schauer *et al.*, 2002) werden.

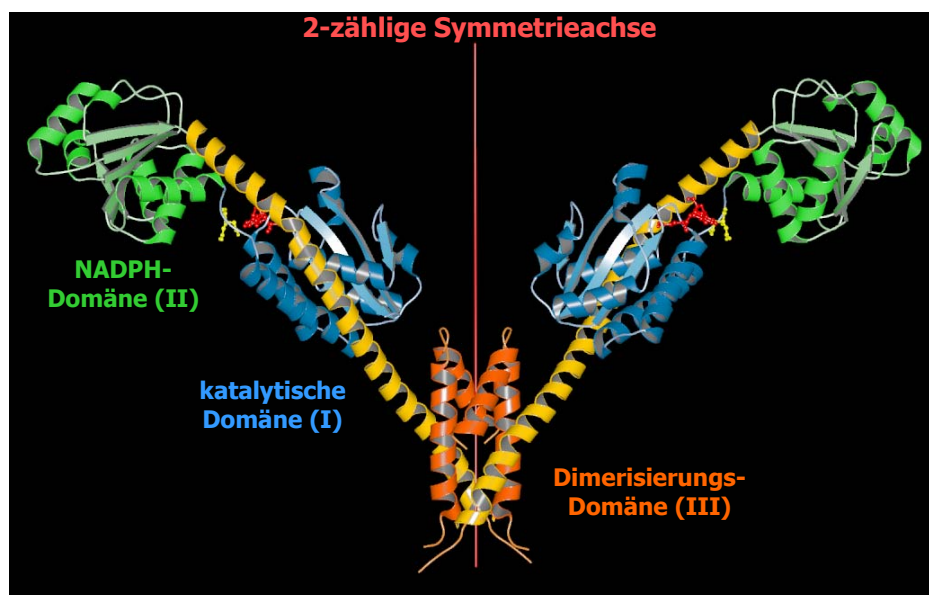


**Abbildung 8: Reaktionsmechanismus der Glutamyl-tRNA Reduktase.**

Die reaktive Sulfhydrylgruppe eines Cysteinrests der GluTR greift nucleophil die  $\alpha$ -Carboxylgruppe der Glutamyl-tRNA<sup>Glu</sup> an. Dabei wird tRNA<sup>Glu</sup> freigesetzt und ein kovalentes Thioester-Zwischenprodukt zwischen Enzym und Glutamat gebildet. In Gegenwart von NADPH wird durch direkte Hydridübertragung GSA gebildet, während ohne NADPH das Zwischenprodukt durch eine Esterase-Aktivität hydrolysiert wird.

Während der Reaktion greift zunächst ein nukleophiler Cysteinrest der GluTR die aktivierte  $\alpha$ -Carboxylgruppe des Substrats Glutamyl-tRNA<sup>Glu</sup> an (Abbildung 8). Dadurch entsteht ein kovalentes Thioester-Zwischenprodukt und tRNA<sup>Glu</sup> wird freigesetzt. Durch direkte Hydridübertragung ausgehend vom Cofaktor NADPH wird das Thioester-Zwischenprodukt zu GSA reduziert. In Abwesenheit von NADPH wird *in vitro* dieses hochreaktive Zwischenprodukt durch die Esterase-Aktivität der GluTR in Glutamat und freie tRNA gespalten.

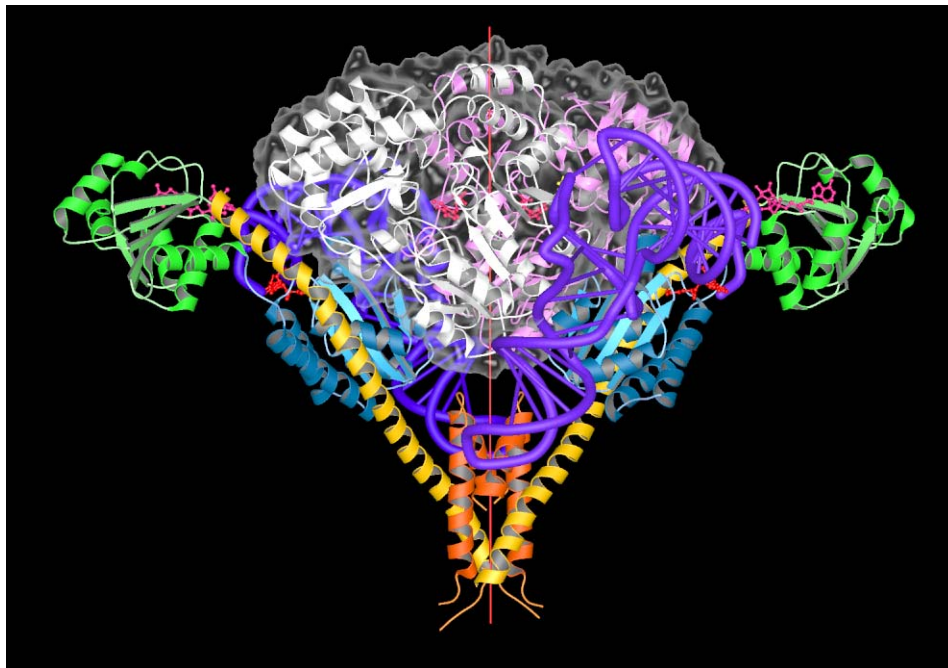
Die Beteiligung des nukleophilen Cysteinrests an der Katalyse wurde mit Hilfe von Modifikationsexperimenten mit 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure, die spezifisch mit Cystein-Seitenketten reagiert, für beide Enzyme gezeigt. Das kovalente Thioester-Zwischenprodukt wurde durch die Übertragung der Radioaktivität von [<sup>14</sup>C]-markierter Glutamyl-tRNA auf die GluTR nachgewiesen. Da sich bei diesem Experiment die  $M_r$  der GluTR nicht signifikant verändert hat, wurde nur [<sup>14</sup>C]Glu und nicht [<sup>14</sup>C]Glu-tRNA<sup>Glu</sup> auf das Enzym übertragen. Zur genauen Identifizierung des an der Reaktion beteiligten Cysteinrests wurden sowohl in der *E. coli* GluTR als auch in der *M. kandleri* GluTR sämtliche Cysteine mittels ortsgerichteter Mutagenese gegen Serine ausgetauscht und die erhaltenen GluTR-Varianten bezüglich ihrer Aktivität untersucht. In beiden Enzymen konnte eine GluTR-Variante identifiziert werden, die zu einem vollständigen Verlust der Reduktase- und Esterase-Aktivität führte. Dieses Cystein ist das einzig konservierte Cystein bei allen bekannten GluTRs.



**Abbildung 9:** Struktur der *M. kandleri* GluTR entlang der zweizähligen Achse betrachtet. Die Monomere bestehen aus drei Domänen: der katalytischen Domäne (blau), der NADPH-Domäne (grün) und der Dimerisierungsdomäne (orange), die entlang einer langen „spinalen“  $\alpha$ -Helix angeordnet sind. Glutamycin (rot) bindet an der katalytischen Domäne (aus Moser *et al.*, 2001).

Die im Jahre 2001 gelöste Kristallstruktur der GluTR aus *M. kandleri* unterstützt den vorgeschlagenen Enzymmechanismus (Moser *et al.*, 2001). Die Struktur zeigt die GluTR als ein ungewöhnliches, ausladendes V-förmiges Dimer. Jedes Monomer besteht dabei aus drei Domänen, die entlang einer gekrümmten „spinalen“  $\alpha$ -Helix angeordnet sind. Die Domänen werden gemäß ihrer Funktion als katalytische, NADPH- und Dimerisierungsdomänen bezeichnet (Abbildung 9).

In einem *in silico* Modell konnte in den zwischen den beiden GluTR-Monomeren entstehenden Zwischenraum die dimere GSA-AM aus *Synechococcus* sp. eingefügt werden. Des Weiteren konnte die *E. coli* tRNA<sup>Glu</sup> ohne sterische Konflikte ergänzt werden, so dass ein *in silico* Modell des ternären Komplexes aus GluTR, GSA-AM und tRNA<sup>Glu</sup> entstand (Abbildung 10).

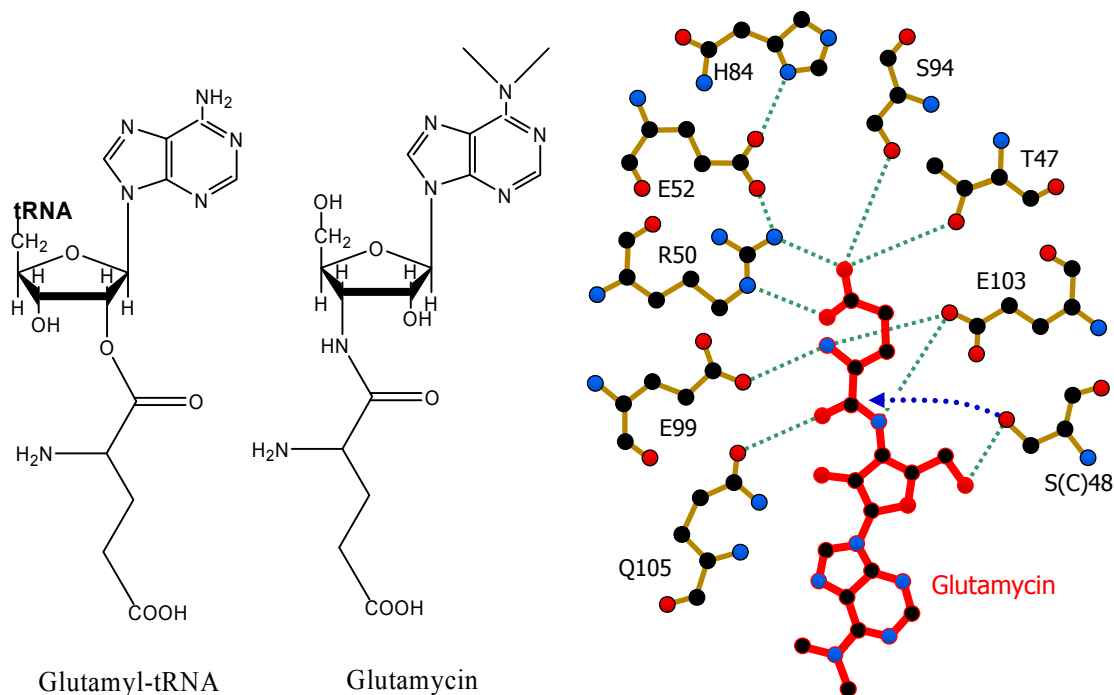


**Abbildung 10: Das *in silico* Modell des ternären Komplexes aus GluTR, GSA-AM und tRNA<sup>Glu</sup>.**  
Ein GluTR Dimer kann unabhängig zwei Moleküle tRNA<sup>Glu</sup> (blau und violett) binden. Die transparente Hülle des GSA-AM Dimers (weiß und rosa) zeigt die signifikante Oberflächenkomplementarität beider Proteindimere. Die drei strukturellen Domänen der GluTR sind die NADPH-Domäne (grün), die katalytische Domäne (blau) und die Dimerisierungsdomäne (orange) (aus Moser *et al.*, 2001).

Es wurde postuliert, dass die Komplexbildung zwischen den ersten beiden Enzymen der Tetrapyrrolbiosynthese ein so genanntes „metabolic channeling“ ermöglicht. Hierbei könnte das reaktive Produkt der GluTR, GSA, direkt vom aktiven Zentrum der GluTR zum aktiven Zentrum der GSA-AM weitergeleitet werden, ohne in Kontakt mit der wässrigen Umgebung zu kommen. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Beobachtung, dass im erstellten *in silico* Modell des GluTR/GSA-AM Komplexes der

Eingang zum aktiven Zentrum der GSA-AM direkt gegenüber einer teilweise geöffneten Vertiefung der katalytischen Domäne der GluTR positioniert ist.

Die Kristallstruktur der GluTR aus *M. kandleri* wurde in Gegenwart des kompetitiven Inhibitors Glutamycin gelöst. Das Substratanalogon Glutamycin (Abbildung 11) wurde auf der Grundlage der antibiotischen Substanz Puromycin synthetisiert (Moser *et al.*, 1999).



**Abbildung 11:** Vergleich der Strukturen des Glu-tRNA<sup>Glu</sup>-Analogons Glutamycin mit der Glu-tRNA<sup>Glu</sup> (links) und Erkennung des Glutamycins innerhalb der Substratbindungstasche der *Methanopyrus kandleri* Glutamyl-tRNA Reduktase (rechts).

Der Glutamat-Anteil des Glutamycins (rote Bindungen) wird durch ein Netzwerk aus spezifischen Wasserstoffbrücken erkannt. Arginin 50 (Nummerierung *M. kandleri*) bildet eine zweifache Salzbrücke zur Carboxylatgruppe des Glutamycins. Der erste Schritt der GluTR-Katalyse, der nukleophile Angriff von Cystein 48 (Nummerierung *M. kandleri*) auf den Carbonyl-Kohlenstoff, ist angedeutet (gepunkteter Pfeil) (aus Moser *et al.*, 2001).

Innerhalb der *M. kandleri* GluTR ist Glutamycin tief in der katalytischen Domäne verborgen und wird durch verschiedene konservierte Aminosäurereste positioniert (Abbildung 11). Der Glutamat-Teil des Substrats wird dabei spezifisch über ein hoch konserviertes Wasserstoffbrückennetzwerk und über eine zweifache Salzbrücke, die von Arginin 50 (Nummerierung *M. kandleri*) gebildet wird, erkannt. Bisher gibt es jedoch noch keine Analyse der Funktion dieser einzelnen Aminosäuren (mit Ausnahme des katalytisch wichtigen Cystein) während der Substraterkennung.

## 1.4 Zielsetzung

Das erste Enzym der Hämbiosynthese, die Glutamyl-tRNA Reduktase, reduziert tRNA<sup>Glu</sup>-gebundenes Glutamat zu dem höchst labilen Glutamat-1-semialdehyd.

Ziel dieser Arbeit war zuerst der Nachweis des aufgrund der gelösten Kristallstrukturen postulierten Komplexes zwischen der Glutamyl-tRNA Reduktase und der Glutamat-1-semialdehyd-2,1-Aminomutase. Die Wechselwirkung der beiden Enzyme sollte mit verschiedenen Methoden, wie Co-Immunopräzipitation und Gelfiltrationsanalysen, verifiziert werden. Hierbei sollte besonders die Bedeutung der Glu-tRNA<sup>Glu</sup> und der Cofaktoren (NADPH und Pyridoxal-5'-phosphat) der beiden Enzyme für die Komplexbildung untersucht werden. Weiterhin sollte die Bedeutung eines möglichen „metabolic channeling“ für die Stabilität des Glutamat-1-semialdehyd analysiert werden. Zur Identifizierung weiterer potentieller Interaktionspartner der Glutamyl-tRNA Reduktase sollten Antikörper gegen die GluRS generiert und in Co-Immunopräzipitationsexperimenten eingesetzt werden.

Die strukturellen Grundlagen der Substraterkennung durch die Glutamyl-tRNA Reduktase, insbesondere des Glutamat-Teils der Glu-tRNA<sup>Glu</sup> sollte mit Hilfe einer misacylierten [<sup>14</sup>C]Gln-tRNA<sup>Glu</sup> und mit bereits vorhandenen sieben Glutamyl-tRNA Reduktase-Varianten untersucht werden. Diese Enzymvarianten trugen Aminosäureaustausche der Reste im aktiven Zentrum die direkt oder indirekt an der Substraterkennung beteiligt sind. Schließlich sollten in dieser Arbeit neue Erkenntnisse bezüglich der bisher noch nicht genau analysierten Reduktion des Enzym-gebundenen Glutamats und der damit verbundenen postulierten Bewegung der NADPH-Domäne gewonnen werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Geräte und Chemikalien

#### 2.1.1 Geräte

|                                    |                               |                    |
|------------------------------------|-------------------------------|--------------------|
| Agarosegelelektrophorese           | Agagel                        | Biometra           |
| Autoklav                           | LVSY 50/70                    | Zirbus             |
| Blotapparatur                      | Trans-Blot <sup>®</sup> SD    | BioRad             |
| CD-Spektrometer                    | J-810 Spectropolarimeter      | Jasco              |
| Elektroporation                    | Gene Pulser II                | BioRad             |
| FPLC                               | ÄKTApurifier                  | GE Healthcare      |
| Geldokumentationsanlage            | Geldoc                        | BioRad             |
| HPLC                               | HPLC System                   | Jasco              |
| pH-Messgerät                       | pH-Meter CG 840 B             | Schott             |
| Photometer                         | Ultrospec 2000                | GE Healthcare      |
| Durchfluss-Radioaktivitäts Monitor | Ramona 2000                   | Raytest            |
| Reinstwasseranlage                 | Milli-Q System                | Millipore          |
| SDS-PAGE Apparatur                 | Mini Protean II               | BioRad             |
| Sequenzierer                       | ABI PRISM <sup>™</sup> 310    | Applied Biosystems |
|                                    | Genetic Analyzer              |                    |
| Szintillationszähler               | Tri-carb 2900 TR              | Packard Bioscience |
| Thermocycler                       | Tpersonal                     | Biometra           |
| Thermomixer                        | Thermomixer compact           | Eppendorf          |
| Ultraschallgerät                   | Sonoplus HD 2070              | Bandelin           |
| UV/VIS Spektrophotometer           | V-550                         | Jasco              |
| Waagen                             | SBA 52                        | Scaltec            |
|                                    | HC 52                         | Mettler            |
| Zentrifugen                        | Centrifuge 5804               | Eppendorf          |
|                                    | Biofuge pica                  | Heraeus            |
|                                    | MiniSpin                      | Eppendorf          |
|                                    | RC 5B Plus                    | Sorvall            |
|                                    | SpeedVac <sup>®</sup> SPD101B | Savant             |
|                                    | L7-65                         | Beckman            |

#### 2.1.2 Chemikalien und Hilfsmittel

|                                              |            |
|----------------------------------------------|------------|
| Kaninchen anti-GluTR Antikörper              | Eurogentec |
| Kaninchen anti-GSA-AM Antikörper             | Eurogentec |
| Kaninchen anti-GluRS Antikörper              | Eurogentec |
| Molekulargewichtstandard für Proteine        |            |
| Precision Plus Protein <sup>™</sup> Standard | Fermentas  |
| Protein Molecular Weight Marker SM0431       | Fermentas  |
| Dalton Mark VII-L                            | Sigma      |
| Molekulargewichtstandard für DNA             |            |
| GeneRuler <sup>™</sup> DNA Ladder Mix        | Fermentas  |

|                                                  |                     |
|--------------------------------------------------|---------------------|
| Oligonukleotide                                  | MWG Biotech         |
| Plastik-Röhrchen                                 | Sarstedt            |
| Protein A Sepharose™ CL-4B                       | GE Healthcare       |
| Proteinbestimmung                                | BioRad              |
| Proteaseinhibitor (Complete, Mini, EDTA-free)    | Roche               |
| PVDF-Membran                                     | Millipore           |
| QuikChange™ Mutagenesis Kit                      | Stratagene          |
| Säulenmaterial                                   | GE Healthcare       |
| Sterilfilter                                     | Millipore/Sartorius |
| Szintillisationsflüssigkeit (OptiPhase HiSafe 2) | Wallac              |
| tRNA <sup>Glu</sup>                              | Sigma               |
| Ultrafiltrationseinheiten                        | Vivascience         |
| Ziege anti-Kaninchen IgG Antikörper              | Pierce              |
| [ <sup>14</sup> C]Glutamat                       | NEN-Life Science    |
| [ <sup>14</sup> C]Glutamin                       | GE Healthcare       |
| [ <sup>14</sup> C]Aminolävulinsäure              | NEN-Life Science    |

Die hier nicht aufgeführten Chemikalien und Reagenzien wurden von folgenden Firmen bezogen: Sigma-Aldrich, Merck, Roth, Fluka, Roche, Serva und Riedel-de-Häen.

## 2.2 Bakterienstämme und Plasmide

### 2.2.1 Bakterienstämme: *Escherichia coli*

| Stamm      | Genotyp                                                                                                                                                                                                                      | Quelle                          |
|------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|
| DH5α       | F <sup>-</sup> <i>supE44D(argF-lac)U169 φ80dlacZΔM15<br/>hsdR17 recA1 end A1 gyrA96 thi-1 relA1</i>                                                                                                                          | Hanahan, 1983                   |
| DH10B      | F <sup>-</sup> <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80dlacZΔM15<br/>ΔlacX74 deoR recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)<br/>7697 galU galK λ<sup>-</sup> L nupG</i>                                                                         | Gibco Life<br>Technologies      |
| BL21(λDE3) | F <sup>-</sup> <i>ompZ r<sup>-</sup>m<sup>-</sup>λlysPlacUV5-T7-GenIPlac<sup>q</sup>-lacI</i>                                                                                                                                | Studier <i>et al.</i> , 1990    |
| EV61       | <i>thr-1 ara-14 leuB6 Δ(gpt-proA)62 lacY1 tsx-33<br/>supE44 galK2 Rac<sup>-</sup> hisG4 rfbD1 mgl-51 rpsL31<br/>kdgK51 xyl-5 mtl-1 argE3 thi-1 recB21 recC22<br/>sbcB15 sbcC201 λ<sup>-</sup> ΔhemA::kan Kan<sup>r</sup></i> | Verkamp & Chelm,<br>1989        |
| GE1387     | F <sup>-</sup> <i>ilvD145 his-85 trpR55 pro-48 tsx-84 hemA204<br/>rpsL8 or -9</i>                                                                                                                                            | Verkamp <i>et al.</i> ,<br>1993 |



### 2.2.2 Plasmide

| Plasmid      | Beschreibung                                                                                                                                                                                                                       | Quelle                                 |
|--------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| pBKCwt       | das <i>E. coli hemA</i> -Gen wurde als <i>Bam</i> HI- <i>B</i> lpI-Fragment in einen pET15b-Vektor kloniert                                                                                                                        | Schauer <i>et al.</i> , 2002           |
| pBKCT49V     | pBKCwt-Derivat, Aminosäureaustausch Threonin 49 gegen Valin                                                                                                                                                                        | Lüer, 2003                             |
| pBKCE54K     | pBKCwt-Derivat, Aminosäureaustausch Glutamat 54 gegen Lysin                                                                                                                                                                        | Lüer, 2003                             |
| pBKCH99N     | pBKCwt-Derivat, Aminosäureaustausch Histidin 99 gegen Asparagin                                                                                                                                                                    | Lüer, 2003                             |
| pBKCS109A    | pBKCwt-Derivat, Aminosäureaustausch Serin 109 gegen Alanin                                                                                                                                                                         | Lüer, 2003                             |
| pBKCCQ116L   | pBKCwt-Derivat, Aminosäureaustausch Glutamin 116 gegen Leucin                                                                                                                                                                      | Lüer, 2003                             |
| pBKCC50S     | pBKCwt-Derivat, Aminosäureaustausch Cystein 50 gegen Serin                                                                                                                                                                         | Schauer, 2003                          |
| pBKCR52Q     | pBKCwt-Derivat, Aminosäureaustausch Arginin 52 gegen Glutamin                                                                                                                                                                      | Schauer, 2003                          |
| pBKCR52K     | pBKCwt-Derivat, Aminosäureaustausch Arginin 52 gegen Lysin                                                                                                                                                                         | Schauer, 2003                          |
| pBKCA338Stop | pBKCwt-Derivat, Aminosäureaustausch Alanin 338 gegen Stoppcodon                                                                                                                                                                    | Schauer, 2003                          |
| pET3glnSwt   | das <i>E. coli glnS</i> -Gen wurde als <i>Bam</i> HI-Fragment in einen pET3-Vektor kloniert                                                                                                                                        | Weygand-Durašević <i>et al.</i> , 1993 |
| pLQ7612      | das <i>E. coli gltX</i> -Gen wurde als <i>Sau</i> 3A- <i>Eco</i> R1-Fragment in einen pOU61-Vektor kloniert                                                                                                                        | Brisson <i>et al.</i> , 1989           |
| pLIpopC      | das <i>E. coli hemL</i> -Gen wurde als <i>Pst</i> I- <i>Dde</i> I-Fragment in einen pET3-Vektor kloniert                                                                                                                           | Ilag <i>et al.</i> , 1991              |
| pGP1-2       | pACYC177-Derivat, enthält ein 3200-bp <i>Bam</i> HI- <i>B</i> g/II-Fragment des T7 <i>l</i> -Gens unter Kontrolle des induzierbaren $\lambda P_L$ -Promotors und das Gen für den Hitze-sensitiven $\lambda$ Repressor <i>cI857</i> | Tabor & Richardson, 1985               |

## 2.3 Medien und Medienzusätze

### 2.3.1 Medien

Für die Kultivierung von *E. coli* wurde ausschließlich das Vollmedium Luria Bertani (LB) verwendet, wie bei Sambrook *et al.* (1989) beschrieben.

|           |                    |    |     |
|-----------|--------------------|----|-----|
| LB-Medium | Trypton aus Casein | 10 | g/l |
|           | Hefe Extrakt       | 5  | g/l |
|           | NaCl               | 10 | g/l |

### 2.3.2 Medienzusätze

Die Medienzusätze wurden als konzentrierte Stammlösungen in den unten angegebenen Konzentrationen angesetzt, sterilfiltriert und unter sterilen Bedingungen dem autoklavierten Medium in den entsprechenden Mengen zugesetzt. Aliquots der Stammlösungen wurden bei -20 °C gelagert.

|            |    |       |
|------------|----|-------|
| Ampicillin | 50 | mg/ml |
| Kanamycin  | 10 | mg/ml |
| IPTG       | 1  | M     |
| ALA        | 10 | mg/ml |

Für Festmedien wurde vor dem Autoklavieren 15 g Agar-Agar pro Liter Medium hinzugefügt.

## 2.4 Mikrobiologische Techniken

### 2.4.1 Sterilisation

Hitzeempfindliche Lösungen wurden mittels Sterilfilter mit einer Porengröße von 0.2 µm sterilfiltriert. Alle anderen Medien und Puffer wurden für 20 min bei 121 °C und 1 bar Überdruck dampfsterilisiert.

## 2.4.2 Bakterienkultivierung

### Plattenkulturen

Zum Anlegen von Plattenkulturen wurden Bakterien mit einer sterilen Impfföse aus einer Glycerinkultur oder von einer anderen Plattenkultur entnommen und auf einer LB-Agar-Platte, die bei Bedarf mit den gewünschten Zusätzen versehen war, fraktioniert ausgestrichen. Bei Entnahme der Bakterien aus einer Flüssigkultur wurden diese mit einem sterilen Drigalski-Spatel auf LB-Agar-Platten ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C invertiert inkubiert.

### Flüssigkulturen

Für Vorkulturen wurden je nach Bedarf 50 - 150 ml LB-Medium im Erlenmeyerkolben mit den entsprechenden Zusätzen versehen, mit einer Einzelkolonie von Platte oder aus einer Glycerinkultur beimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Ausgehend von diesen Vorkulturen wurden 500 ml LB-Medium in 1 l Schikanekolben in einem Verhältnis von 1:100 beimpft und bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Die Induktion der Proteinproduktion und die Zellernte erfolgten je nach Zelldichte entsprechend dem zu produzierenden Protein (siehe **2.6.1 - 2.6.4**).

### Wachstumsbedingungen für den *Escherichia coli hemA<sup>-</sup>*-Stamm EV61

Der *E. coli hemA<sup>-</sup>*-Stamm EV61 besitzt durch den Einbau einer Kanamycinresistenzkassette eine Deletion von ca. 750 bp im *hemA*-Gen. Als Folge davon wird keine aktive GluTR produziert und der Stamm kann nur mit zusätzlicher ALA-Zugabe im Medium wachsen. Die Kultivierung der EV61-Zellen erfolgte in LB-Medium, welches mit 50 µg/ml ALA versehen war. Für die Selektion auf die Kanamycinresistenz wurde dem Medium bei Bedarf 50 µg/ml Kanamycin zugefügt werden.

### Wachstumsbedingungen für den *Escherichia coli hemA<sup>-</sup>*-Stamm GE1387

Der ALA-auxotrophe *E. coli* Stamm GE1387 ist durch eine Mutation im *hemA*-Gen nicht mehr in der Lage das für alle Tetrapyrrole benötigte Vorläufermolekül ALA zu bilden (Verkamp *et al.*, 1993). Zur Komplementation der *hemA*-Defizienz wurden die Plasmide, die für die Wildtyp-GluTR und die verschiedenen Mutanten kodieren, zusammen mit dem hitzeinduzierbaren, für die T7 RNA Polymerase kodierenden

Plasmid pGP1-2 in GE1387-Zellen transformiert. Die Kultivierung der GE1387-Zellen erfolgte in LB-Medium, welches mit 50 µg/ml ALA versehen war. Nach der Transformation mit den für die verschiedenen GluTR-Varianten kodierenden Plasmiden und dem für die T7 RNA Polymerase kodierenden Plasmid pGP1-2 wurden die Transformationsansätze auf LB-Agar-Platten mit 50 µg/ml ALA, 100 µg/ml Ampicillin und 10 µg/ml Kanamycin ausplattiert. Mit einer über Nacht gewachsenen Einzelkolonie wurden 3 ml LB-Medium, das ebenfalls 50 µg/ml ALA, 100 µg/ml Ampicillin und 10 µg/ml Kanamycin enthielt, beimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach der Zellernte wurden die Zellen dreimal mit 1 ml LB-Medium gewaschen, um eventuell noch vorhandene ALA zu entfernen. Mit den so erhaltenen Zellen wurden 50 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 10 µg/ml Kanamycin beimpft.

### **2.4.3 Bestimmung von Zelldichten**

Die Zelldichte der Flüssigkulturen wurde mittels Photometer durch Messen der OD bei 578 nm bestimmt. Ab einer  $OD_{578nm} \geq 0.6$  wurde eine 1:10 Verdünnung der Kultur vermessen. Eine  $OD_{578nm}$  von 1 entspricht hierbei einer Zellzahl von  $1 \times 10^9$  Zellen pro ml.

### **2.4.4 Lagerung von Bakterien**

Zur langfristigen Lagerung von Bakterien wurden Glycerinkulturen angelegt. Hierfür wurden 600 µl einer Bakterienkultur mit 200 µl sterilem 80 %igen (w/v) Glycerin versetzt und gut gemischt. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

## **2.5 Molekularbiologische Methoden**

### **2.5.1 Herstellung elektrokompetenter *Escherichia coli*-Zellen**

Zur Herstellung von elektrokompetenten *E. coli*-Zellen wurden 500 ml Flüssigkultur mit LB-Medium bis zu einer  $OD_{578nm}$  von 0.6 kultiviert. Anschließend wurde die Kultur auf Eis abgekühlt und zentrifugiert (Sorvall, RC 5B Plus, SLA 3000, 5'000 rpm; 10 min; 4 °C). Das Zellsediment wurde in 40 ml sterilem, deionisierten Wasser gut resuspendiert, in 50 ml Plastik-Röhrchen überführt, zentrifugiert (Eppendorf, Centrifuge

5804, A-4-44, 5'000 rpm; 10 min; 4 °C) und erneut mit sterilem, deionisierten Wasser gewaschen. Die sedimentierten, gewaschenen Zellen wurden in einem Volumenteil (~700 µl) steriler 10 %iger (v/v) Glycerinlösung resuspendiert und in 90 µl Portionen aufgeteilt, welche bei -80 °C gelagert wurden.

### **2.5.2 Transformation elektrokompenter *Escherichia coli*-Zellen**

Die Transformation erfolgte durch Elektroporation mit Hilfe eines Gene Pulsers mit angeschlossenem Pulse Controller (BioRad). Dazu wurden 40 µl elektrokompente *E. coli*-Zellen und 1 µg Plasmid-DNA in eine Transformationsküvette überführt und im Gene Pulser einer Feldstärke von 12 kV/cm bei 25 µF und einem parallelen Widerstand von 200 Ω ausgesetzt. Zur anschließenden Regeneration wurden die transformierten Zellen sofort in 1 ml LB-Medium überführt und für 30 min bei 37 °C schüttelnd im Thermomixer inkubiert. Von den Ansätzen wurden verschiedene Volumina auf LB-Agar-Platten mit entsprechendem Antibiotikazusatz ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### **2.5.3 Herstellung chemisch kompetenter *Escherichia coli*-Zellen**

Die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte nach der Calcium-Chlorid Methode. Hierfür wurden von einer Glycerinkultur 3 ml LB-Medium im Reagenzglas beimpft und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Diese Vorkultur wurde dann vollständig in 400 ml LB-Medium im 1 l Schikanekolben überführt und bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD<sub>578nm</sub> von 0.6 inkubiert. Alle anschließenden Schritte erfolgten bei 4 °C und unter sterilen Bedingungen. Die abgekühlte Zellsuspension wurde bei 4 °C für 10 min (Sorvall, RC 5B Plus, SLA 3000, 5'000 rpm) zentrifugiert und das Zellsediment dreimal mit je 40 ml eiskalter CaCl<sub>2</sub>-Lösung gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Zellsediment in 10 ml CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und in Portionen zu je 350 µl bei -80 °C gelagert.

### 2.5.3.1 Lösungen zur Herstellung chemisch kompetenter *Escherichia coli*-Zellen

|                           |                     |      |       |
|---------------------------|---------------------|------|-------|
| CaCl <sub>2</sub> -Lösung | CaCl <sub>2</sub>   | 60   | mM    |
|                           | Glycerin            | 15 % | (w/v) |
|                           | PIPES-NaOH (pH 7.0) | 10   | mM    |

### 2.5.4 Transformation chemisch kompetenter *Escherichia coli*-Zellen

Zur Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen wurden diese einem Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt. Dafür wurden 100 µl kompetente Zellen mit 5 - 50 ng Plasmid-DNA gemischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock bei 42 °C für genau 2 min. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium zu jedem Ansatz wurden die Suspensionen bei 37 °C für 30 - 60 min inkubiert und anschließend wurden verschiedene Volumina auf LB-Agar-Platten mit entsprechenden Zusätzen ausplattiert. Die LB-Agar-Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### 2.5.5 Präparation von Plasmid-DNA

Die Plasmid-DNA Minipräparation erfolgte mittels alkalischer Lyse der Wirtszellen. Dafür wurden von einer 3 ml Übernachtskultur 2 ml abgenommen und für 5 min (Eppendorf, MiniSpin, 13'400 rpm) zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 150 µl GTE-Lösung resuspendiert und für 5 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Zell-Lyse durch Zugabe von 300 µl NaOH/SDS, vorsichtiges Mischen durch Invertieren und Inkubation für 5 min. Nach Zugabe von 225 µl NaAc (pH 4.8) wurden die Ansätze wiederum vorsichtig gemischt, für weitere 5 min inkubiert und dann für 15 min (Eppendorf, MiniSpin, 13'400 rpm) zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde mit 600 µl Isopropanol versetzt, gemischt und nach einer Inkubation von 2 min für 10 min zentrifugiert (Eppendorf, MiniSpin, 13'400 rpm) um die Plasmid-DNA zu präzipitieren. Danach wurde die sedimentierte DNA in 200 µl TES resuspendiert, mit 5 µl RNase versetzt und für etwa 1 h bei 37 °C inkubiert. Es folgte eine Extraktion mit 200 µl Roti<sup>®</sup>-Phenol/C/I (25/24/1) und eine Zentrifugation von 3 min (Eppendorf, MiniSpin, 13'400 rpm). Die obere Phase wurde in ein neues steriles Eppendorfreaktionsgefäß überführt und zur erneuten Fällung der Plasmid-DNA mit 400 µl Ethanol versetzt, gemischt und für 5 min inkubiert. Anschließend wurde für 20 min zentrifugiert

(Eppendorf, MiniSpin, 13'400 rpm). Um restliche Phenolrückstände vollständig zu entfernen, erfolgte nochmals eine Fällung der Plasmid-DNA, indem das Sediment in 200 µl 300 mM NaAc (pH 4.8) aufgenommen, mit 400 µl Ethanol versetzt und nach dem Mischen für 5 min inkubiert wurde. Nach Zentrifugation für 15 min (Eppendorf, MiniSpin, 13'400 rpm) wurde das erhaltene Sediment bei 37 °C für 15 - 20 min getrocknet und schließlich in 30 µl sterilem H<sub>2</sub>O aufgenommen. Alle Schritte erfolgten, wenn nicht anders angegeben, bei RT.

### 2.5.5.1 Lösungen zur Präparation von Plasmid-DNA

|          |                                                      |     |       |
|----------|------------------------------------------------------|-----|-------|
| GTE      | Glukose                                              | 50  | mM    |
|          | Tris-HCl (pH 8.0)                                    | 25  | mM    |
|          | EDTA                                                 | 10  | mM    |
| NaOH/SDS | NaOH                                                 | 200 | mM    |
|          | SDS                                                  | 1 % | (w/v) |
| NaAc     | Natriumacetat<br>(pH 4.8 mit Essigsäure eingestellt) | 3   | M     |
| TES      | Tris-HCl (pH 8.0)                                    | 50  | mM    |
|          | EDTA                                                 | 10  | mM    |
|          | NaCl                                                 | 150 | mM    |
| RNase    | RNase (in 50 % Glycerin)                             | 10  | g/l   |

### 2.5.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration und Reinheit einer DNA- bzw. RNA-Lösung wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm, 280 nm und 320 nm mit einem Photometer bestimmt. Dabei wurde davon ausgegangen, dass einer  $A_{260\text{nm}}$  von 1.0 näherungsweise einer Konzentration von 50 µg/ml ds-DNA bzw. 40 µg/ml RNA entspricht. Die Reinheit der entsprechenden Lösung ergab sich aus dem Quotienten zwischen  $A_{260\text{nm}}$  und  $A_{280\text{nm}}$ . Ein

Quotient von 1.8 entspricht dabei einer reinen ds-DNA Lösung, ein Quotient von 2.0 entspricht einer reinen RNA-Lösung.

### 2.5.7 Agarosegelelektrophorese

Zur analytischen Trennung und Identifizierung von DNA-Fragmenten wurde die Agarosegelelektrophorese verwendet. Durch das Anlegen einer elektrischen Spannung von 90 - 110 V an eine sich in TAE-Puffer befindenden Agarosegelmatrix (1 % (w/v)) erfolgte die Trennung der Nukleinsäurefragmente in dem so erzeugten elektrischen Feld proportional zum negativen Logarithmus ihrer Länge. Die Gele wurden anschließend in einer Ethidiumbromid-Lösung für 30 min inkubiert, bevor die Nukleinsäuren nach Anregung bei 312 nm durch die Fluoreszenz des interkalierenden Farbstoffs sichtbar gemacht wurden. Eine Längenbestimmung der DNA-Fragmente konnte durch Vergleich mit dem Längenstandard „GeneRuler™ DNA Ladder Mix“ der Firma Fermentas durchgeführt werden.

#### 2.5.7.1 Lösungen für die Agarosegelelektrophorese

|                       |                                    |             |
|-----------------------|------------------------------------|-------------|
| TAE-Puffer            | Tris-Acetat (pH 8.5)               | 40 mM       |
|                       | EDTA                               | 1 mM        |
| Agarosegel            | Agarose in TAE-Puffer              | 1 % (w/v)   |
| DNA-Probenpuffer      | Glycerin                           | 50 % (w/v)  |
|                       | Bromphenolblau                     | 400 mM      |
|                       | Xylencyanol                        | 400 mM      |
| Ethidiumbromid-Lösung | Ethidiumbromid in H <sub>2</sub> O | 0.1 % (w/v) |

### 2.5.8 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzen von Plasmiden wurden durch Sequenzierung überprüft. Diese wurde entweder automatisiert durch die Firma MWG-Biotech (Ebersberg) oder mit Hilfe des Sequenziergeräts ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)



durchgeführt. Zur Analyse der erhaltenen Sequenzen wurden die Programme Chromas (Version 1.45) und Seqman (DNASTar Softwarepaket) verwendet.

#### PCR-Reaktion für die Sequenzierung

Für die Sequenzier-PCR wurden jeweils 10 µl Ansätze verwendet. Jeder PCR-Ansatz enthielt 2 µl ABI-Premix (dNTPs, ddNTPs, Puffer, Polymerase), 2 µl 5 x Puffer (Applied Biosystems) und 1 µl des Sequenzierprimers (10 pmol/µl). Zudem wurden jeweils etwa 1 - 2 µg DNA für die Sequenzier-PCR eingesetzt. Der Ansatz wurde anschließend mit sterilem H<sub>2</sub>O auf 10 µl aufgefüllt.

#### PCR-Programm für die Sequenzierung

Für die PCR wurde folgendes Standard-Programm verwendet

| Temperatur | Zeit   | Funktion      |                   |
|------------|--------|---------------|-------------------|
| 96 °C      | 1 min  | Denaturierung |                   |
| 96 °C      | 30 sec | } x 25        | Denaturierung     |
| 50 °C      | 15 sec |               | Primer-Anlagerung |
| 60 °C      | 4 min  |               | Verlängerung      |

#### Reinigung der Produkte der Sequenzier-PCR

Zur Reinigung der Sequenzier-Reaktion wurden zunächst 90 µl steriles H<sub>2</sub>O zur PCR-Reaktion zugegeben und der Ansatz in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 10 µl Natriumacetat (3 M, pH 4.8), 250 µl Ethanol und 1 µl Glycogen, Inkubation für 20 min bei RT und anschließender Zentrifugation für 15 min (Eppendorf, Centrifuge 5804, F 45-30-11, 14'000 rpm; 4 °C), wurde die DNA gefällt. Die präzipitierte DNA wurde zweimal mit je 300 µl 70 %igem (v/v) Ethanol gewaschen und für 5 min zentrifugiert (Eppendorf, Centrifuge 5804, F 45-30-11, 14'000 rpm; 4 °C). Danach wurde die DNA für 15 - 20 min bei 37 °C getrocknet, in 12.5 µl HiDi-Lösung (Applied Biosciences) resuspendiert, luftblasenfrei in ein Sequenziergefäß überführt, das mit einem Septum verschlossen wurde, und im ABI PRISM<sup>TM</sup> 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) sequenziert.

## 2.6 Proteinproduktion und -reinigung

### 2.6.1 Rekombinante Produktion und chromatographische Reinigung der *Escherichia coli* Glutamyl-tRNA Reduktase

#### 2.6.1.1 Bakterienkultivierung

Für die rekombinante Proteinproduktion wurden BL21( $\lambda$ DE3)-Zellen jeweils mit den verschiedenen GluTR kodierenden Plasmiden (Wildtyp bzw. die untersuchten Mutanten) transformiert und anschließend Glycerinkulturen angelegt. Von diesen Glycerinkulturen wurden dann 150 ml LB-Medium mit 100  $\mu$ g/ml Ampicillin als Vorkultur angeimpft. Ausgehend von dieser wurden 500 ml LB-Medium im 1 l Schikanekolben mit ebenfalls 100  $\mu$ g/ml Ampicillin versetzt und mit 5 ml der Vorkultur angeimpft. Die Induktion der Proteinproduktion erfolgte bei einer OD<sub>578nm</sub> von 0.6 - 0.7 durch Zugabe von 250  $\mu$ M IPTG. Außerdem wurde zu diesem Zeitpunkt zusätzlich 1 ml der Ampicillin-Stammlösung hinzugegeben. Zwei Stunden nach Induktion wurden die Zellen durch Zentrifugation (Sorvall, RC 5B Plus, SLA 3000, 5'000 rpm; 10 min; 4 °C) geerntet und das Zellsediment in 100 mM Tris-HCl (pH 8.0) resuspendiert. Die Suspension wurde in 50 ml Plastik-Röhrchen überführt, nochmals zentrifugiert (Eppendorf, Centrifuge 5804, A-4-44, 5'000 rpm; 10 min; 4 °C) und die sedimentierten Zellen bei -20 °C gelagert.

#### 2.6.1.2 Zellaufschluss und Reinigung der Einschlusskörper

Zur Isolierung der Einschlusskörper, ab jetzt „inclusion bodies“ genannt, wurden je 1.5 g Zellen (Nassgewicht) aus 500 ml Kultur in 10 ml GluTR-Aufschlusspuffer resuspendiert. Nach einer Inkubation von 10 min bei RT erfolgte der Zellaufschluss mittels Ultraschall (Bandelin, Sonoplus HD 2070, KE76; 0.5 sec Puls, 0.5 sec Pause, 70 % Amplitude) und die entstandene Suspension wurde zentrifugiert (Sorvall, RC 5B Plus, SS34, 20'000 rpm; 10 min; 4 °C). Im nächsten Reinigungsschritt wurde das Sediment zweimal mit 20 ml GluTR-Isolierungspuffer gewaschen, indem es durch Ultraschall (Bandelin, Sonoplus HD 2070, KE76, 0.5 sec Puls; 0.5 sec Pause; 70 % Amplitude) resuspendiert und anschließend zentrifugiert (Sorvall, RC 5B Plus, SS34, 10'000 rpm; 10 min; 4 °C) wurde. Das Sediment wurde im letzten Schritt mit 20 ml

100 mM Tris-HCl (pH 8.0) erneut gewaschen und die so gereinigten „inclusion bodies“ bei -20 °C gelagert.

#### **2.6.1.3 Faltung der Glutamyl-tRNA Reduktase aus „inclusion bodies“ mittels Ni<sup>2+</sup>-beladener Chelating Sepharose<sup>TM</sup>**

Sowohl die Wildtyp *E. coli* GluTR als auch alle GluTR-Mutantenenzyme wurden als denaturierte His<sub>6</sub>Tag-Fusionsproteine über eine mit Ni<sup>2+</sup>-beladene Chelating Sepharose<sup>TM</sup> Fast Flow Säule (GE Healthcare) gereinigt und anschließend auf der Säule in ihre native Konformation zurückgefaltet (Schauer *et al.*, 2003). Hierbei bindet der His<sub>6</sub>Tag des Proteins über seine Stickstoffatome spezifisch an die auf der Säule gebundenen Nickelatome. Die selektive Bindung des His<sub>6</sub>Tag-Fusionsproteins aus den gelösten „inclusion bodies“ an das Chromatographiematerial erfolgte unter denaturierenden Bedingungen von 6 M Guanidinium-HCl. Nachfolgend fand die Rückfaltung der gebundenen Proteine durch einen Pufferwechsel von denaturierenden Bedingungen hin zu nativen Bedingungen statt. Die Elution der Proteine erfolgte durch eine Imidazol-Stoßelution (500 mM).

Für die Rückfaltung und Reinigung der GluTR wurde das Säulenmaterial Chelating Sepharose<sup>TM</sup> Fast Flow (GE Healthcare) verwendet. Zunächst wurde die Säule (40 ml) mit 2 - 3 Säulenvolumen einer 100 mM NiSO<sub>4</sub>-Lösung beladen, mit MilliQ-Wasser gewaschen und vor dem Auftrag des Proteins in Puffer S äquilibriert.

Das Protein wurde in der folgenden Weise für den Auftrag auf die Säule vorbereitet: 100 mg der „inclusion bodies“ wurden in 40 ml Puffer S resuspendiert und zur Abtrennung von unlöslichen Anteilen zentrifugiert (Sorvall, RC 5B Plus, SS34, 20'000 rpm; 15 min; 4 °C). Der von Verunreinigungen befreite Überstand wurde mit Puffer S auf 150 ml verdünnt und mit einer Flussrate von 4 ml/min auf die Säule aufgebracht. Zum Entfernen von nicht gebundenem Protein wurde die Säule mit Puffer F mit gleicher Flussrate gewaschen. Die Rückfaltung der auf der Säule gebundenen Proteine erfolgte durch einen Austausch von Puffer F (6 M Harnstoff) zu Puffer W (0 M Harnstoff) über einen linearen Gradienten über 30 Säulenvolumen bei einer Flussrate von 1.11 ml/min. Anschließend wurden die Proteine durch Puffer E mit 4 ml/min von der Säule eluiert und fraktioniert (5 ml) aufgefangen.

### 2.6.1.4 Trennung von unspezifischen Proteinaggregaten der Glutamyl-tRNA Reduktase durch Gelpermeationschromatographie

Bei der Rückfaltung der Proteine auf der mit  $\text{Ni}^{2+}$ -beladenen Chelating Sepharose<sup>TM</sup>-Säule entstehen neben der nativen, dimeren Form der GluTR auch undefinierte GluTR-Aggregate. Diese wurden durch Gelpermeationschromatographie (GPC) von der gewünschten nativen GluTR getrennt.

Die GluTR enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt (ca. 10 ml) und auf eine Superdex 200 HR 26/60 Säule (Säulenvolumen = 310 ml) der Firma GE Healthcare, die zuvor mit GPC-Puffer äquilibriert wurde, aufgetragen. Die Trennung der aggregierten von den nativen Proteinen erfolgte bei einer Flussrate von 1.6 ml/min. Fraktionen, die native, aggregatfreie GluTR enthielten, wurden vereinigt, durch Ultrafiltration (Vivaspin15, Ausschlussgrenze 30'000) konzentriert und unverzüglich in 20 - 50 µl Portionen bei -80 °C gelagert.

### 2.6.1.5 Lösungen zur Reinigung und Faltung der Glutamyl-tRNA Reduktase

|                         |                   |     |        |
|-------------------------|-------------------|-----|--------|
| GluTR-Aufschlusspuffer  | Tris-HCl (pH 8.0) | 100 | mM     |
|                         | Lysozym           | 200 | µg/ml  |
| GluTR-Isolierungspuffer | Harnstoff         | 2   | M      |
|                         | Tris-HCl (pH 8.0) | 20  | mM     |
|                         | NaCl              | 500 | mM     |
|                         | Triton X-100      | 0.2 | %(w/v) |
| Puffer S                | Guanidinium-HCl   | 6   | M      |
|                         | Tris-HCl (pH 8.0) | 20  | mM     |
|                         | NaCl              | 500 | mM     |
|                         | β-Mercaptoethanol | 5   | mM     |
| Puffer F                | Harnstoff         | 6   | M      |
|                         | Tris-HCl (pH 8.0) | 20  | mM     |
|                         | NaCl              | 500 | mM     |
|                         | β-Mercaptoethanol | 5   | mM     |

|            |                          |             |
|------------|--------------------------|-------------|
| Puffer W   | Tris-HCl (pH 8.0)        | 20 mM       |
|            | NaCl                     | 500 mM      |
|            | Glycerin                 | 20 % (v/v)  |
|            | $\beta$ -Mercaptoethanol | 5 mM        |
| Puffer E   | Tris-HCl (pH 8.0)        | 20 mM       |
|            | NaCl                     | 500 mM      |
|            | Imidazol                 | 500 mM      |
|            | Glycerin                 | 20 % (v/v)  |
|            | $\beta$ -Mercaptoethanol | 5 mM        |
|            | CHAPS                    | 1 mM        |
| GPC-Puffer | HEPES (pH 8.0)           | 20 mM       |
|            | NaCl                     | 200 mM      |
|            | Glycerin                 | 20 % (v/v)  |
|            | CHAPS                    | 500 $\mu$ M |
|            | DTT                      | 10 mM       |

## 2.6.2 Rekombinante Produktion und chromatographische Reinigung der *Escherichia coli* Glutaminyl-tRNA Synthetase

### 2.6.2.1 Bakterienkultivierung

Ausgehend von einer Glycerinkultur BL21( $\lambda$ DE3)-Zellen, die das für die *E. coli* Glutaminyl-tRNA Synthetase (GlnRS) kodierende Plasmid pET3glnSwt enthalten, wurde eine 150 ml Vorkultur (LB-Medium mit 100  $\mu$ g/ml Ampicillin) angeimpft. Für die Proteinproduktion wurden 500 ml LB-Medium, welches ebenfalls 100  $\mu$ g/ml Ampicillin enthielt, mit 5 ml der Vorkultur angeimpft und zunächst bis zu einer OD<sub>578nm</sub> von 0.7 bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Die Induktion der Proteinproduktion erfolgte durch Zugabe von 400  $\mu$ M IPTG. Zusätzlich wurde erneut 1 ml Ampicillin-Stammlösung zu je 500 ml Kultur gegeben. Die Ernte der Zellen erfolgte 3 h nach der Induktion durch Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 5'000 rpm (Sorvall, RC 5B Plus, SLA 3000). Das entstandene Zellsediment wurde in 100 mM Tris-HCl (pH 8.0) resuspendiert und in ein 50 ml Plastik-Röhrchen überführt. Nach erneuter

Zentrifugation (Eppendorf, Centrifuge 5804, A-4-44, 5'000 rpm; 10 min; 4 °C) wurden die sedimentierten Zellen bei -20 °C gelagert.

#### **2.6.2.2 Zellaufschluss**

Für die Reinigung der GlnRS wurden 1.2 g *E. coli*-Zellen in 7 ml GlnRS-Aufschlusspuffer resuspendiert und die Zellen durch Ultraschall aufgeschlossen (Bandelin, Sonoplus HD 2070, KE76, 10 min; 0.5 sec Puls; 0.5 sec Pause; 70 % Amplitude). Die Abtrennung der unlöslichen Zellbestandteile erfolgte durch Zentrifugation der Suspension in der Ultrazentrifuge (Beckman, L7-65, Ti70.1, 50'000 rpm; 30 min; 4 °C).

#### **2.6.2.3 Erste Anionenaustauschchromatographie an MonoQ**

Vom erhaltenen Überstand wurden 5 ml abgenommen, mit einem Sterilfilter filtriert und mit einer Flussrate von 4 ml/min auf eine MonoQ HR 10/10 Säule der Firma GE Healthcare aufgetragen, die zuvor mit GlnRS-Puffer A äquilibriert wurde. Nicht gebundene Proteine wurden anschließend mit 2 Säulenvolumen GlnRS-Puffer A ausgewaschen. Durch einen linearen Salzgradienten von 0 M NaCl (100 % GlnRS-Puffer A) bis 1 M NaCl (100 % GlnRS-Puffer B) über 20 Säulenvolumen wurden die Proteine von der Säule mit ebenfalls 4 ml/min eluiert und in Fraktionen von 5 ml aufgefangen.

#### **2.6.2.4 Zweite Anionenaustauschchromatographie an MonoQ**

Um die GlnRS von restlichen Verunreinigungen zu trennen, wurde eine zweite Anionenaustauschchromatographie mit einem flacheren Salzgradienten durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die GlnRS-enthaltenden Fraktionen der ersten Anionenaustauschchromatographie vereinigt (~10 ml, Proteinkonzentration ~10 mg/ml Protein), filtriert und zur Verringerung der Salzkonzentration mit GlnRS-Puffer A auf 150 ml verdünnt. Da die GlnRS bei einer Salzkonzentration von 150 mM NaCl eluiert, wurde für die zweite Anionenaustauschchromatographie ein Salzgradient von 0 - 250 mM NaCl über 20 Säulenvolumen verwendet. Die GlnRS-enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und durch Ultrafiltration (Vivaspin15, Ausschlussgrenze

30'000) auf ein Endvolumen von 380 µl konzentriert (Eppendorf, Centrifuge 5804, A-4-44, 3'000 rpm; 30 min; 4 °C). Das Konzentrat wurde mit dem dreifachen Volumen Dialysepuffer verdünnt und über Nacht dialysiert. Nach der Dialyse besaß die Proteinlösung eine Konzentration von 8 mg/ml und wurde bei -20 °C gelagert.

#### 2.6.2.5 Lösungen zur Reinigung der *Escherichia coli* Glutaminyl-tRNA Synthetase

|                        |                                                  |            |
|------------------------|--------------------------------------------------|------------|
| GlnRS-Aufschlusspuffer | Tris-HCl (pH 7.8)                                | 20 mM      |
|                        | Glycerin                                         | 10 % (w/v) |
|                        | DTT                                              | 500 µM     |
|                        | Proteaseinhibitor<br>(Complete, Mini, EDTA-free) | ½ Tablette |
|                        |                                                  |            |
| GlnRS-Puffer A         | Tris-HCl (pH 7.8)                                | 20 mM      |
|                        | Glycerin                                         | 10 % (w/v) |
|                        | DTT                                              | 500 µM     |
| GlnRS-Puffer B         | Tris-HCl (pH 7.8)                                | 20 mM      |
|                        | Glycerin                                         | 10 % (w/v) |
|                        | DTT                                              | 500 µM     |
|                        | NaCl                                             | 1 M        |
| GlnRS-Dialysepuffer    | Glycerin                                         | 50 % (w/v) |
|                        | Kaliumphosphatpuffer (pH 7.5)                    | 20 mM      |
|                        | KCl                                              | 50 mM      |
|                        | DTT                                              | 1 mM       |

#### 2.6.3 Rekombinante Produktion und chromatographische Reinigung der *Escherichia coli* Glutamyl-tRNA Synthetase

Die Reinigung der GluRS erfolgte nach der Methode von Lin *et al.* (1992). Dabei handelt es sich im ersten Schritt um eine Verteilung des Zellextrakts in einem flüssig/flüssig Zweiphasensystem (Polyethylenglycol-Dextran). Anschließend wird die verdünnte obere Phase direkt auf eine Anionenaustauschsäule (MonoQ) gegeben.

### 2.6.3.1 Bakterienkultivierung

Von einer Glycerinkultur DH5 $\alpha$ /pLQ7612-Zellen wurden 150 ml LB-Medium mit 100  $\mu$ g/ml Ampicillin als Vorkultur angeimpft. Davon ausgehend wurden mehrere 1 l Schikanekolben mit jeweils 500 ml LB-Medium und 100  $\mu$ g/ml Ampicillin im Verhältnis 1:100 angeimpft und bis zu einer OD<sub>578nm</sub> von 0.2 bei 32 °C und 200 rpm inkubiert. Die Induktion erfolgte durch die Inkubation der Kulturen bei 43 °C und 200 rpm für 50 min. Anschließend wurden die Zellen bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD<sub>578nm</sub> von 0.8 inkubiert und dann durch Zentrifugation geerntet (Sorvall, RC 5B Plus, SLA 3000, 5'000 rpm; 10 min; 4 °C). Die sedimentierten Zellen wurden in 100 mM Tris-HCl (pH 8.0) resuspendiert, für eine erneute Zentrifugation (Eppendorf, Centrifuge 5804, A-4-44, 5'000 rpm; 10 min; 4 °C) in ein 50 ml Plastik-Röhrchen überführt und als Zellsediment bei -20 °C gelagert.

### 2.6.3.2 Zellaufschluss

Die aus 1 l erhaltenen 2.45 g Nasszellen wurden in 10 ml GluRS-Aufschlusspuffer resuspendiert und mittels Ultraschall (Bandelin, Sonoplus HD 2070, KE76, 12 min; 0.5 sec Puls; 0.5 sec Pause; 70 % Amplitude) in einem eisgekühlten 50 ml Plastik-Gefäß aufgeschlossen. Zur Abtrennung der Zelltrümmer wurde die entstandene Suspension für 45 min bei 4 °C zentrifugiert (Sorvall, RC 5B Plus, SS34, 18'000 rpm).

### 2.6.3.3 Zwei-Phasen-Verteilung

Für die Zwei-Phasen-Verteilung wurde der Überstand (ca. 11 ml) mit 1.4 g Polyethylenglycol 8'000 und 300 mg Dextran T500 gelöst in ca. 7 ml 20 mM Tris-HCl (pH 7.8) und 10 % (w/v) Glycerin versetzt. Anschließend wurde mit 20 mM Tris-HCl (pH 7.8) und 10 % (w/v) Glycerin auf 20 ml aufgefüllt. Zur Herstellung einer homogenen Lösung wurde dieser Ansatz für 1 h bei 4 °C geschüttelt. Die Trennung der zwei Phasen fand durch nachfolgende Zentrifugation (Sorvall, RC 5B Plus, SS34, 18'000 rpm; 15 min; 4 °C) statt. Nach der Zentrifugation war die GluRS in der oberen Phase angereichert.



#### 2.6.3.4 Anionenaustauschchromatographie an MonoQ

Diese obere Phase (~15 ml) wurde zur Vorbereitung für die Anionenaustauschchromatographie erneut zentrifugiert (Sorvall, RC 5B Plus, SS34, 16'000 rpm; 10 min; 4 °C) und der Überstand anschließend mit GluRS-Puffer 1 auf 50 ml aufgefüllt. Im zweiten Reinigungsschritt wurden diese 50 ml (ca. 1 mg/ml Proteinkonzentration) auf eine MonoQ HR 10/10 Säule (GE Healthcare), die zuvor in GluRS-Puffer 1 äquilibriert wurde, mit einer Flussrate von 3 ml/min aufgetragen. Zur Abtrennung von Verunreinigungen wurde die Säule als nächstes mit GluRS-Puffer 1 gewaschen. Die Elution der Proteine erfolgte anschließend durch einen linearen Salzgradienten von 0 - 500 mM NaCl über 200 ml mit einer Flussrate von 4 ml/min. Die GluRS enthaltenden Fraktionen (je 5 ml) wurden vereinigt (10 ml mit ca. 2 mg/ml Protein) und durch Ultrafiltration (Vivaspin15, Ausschlussgrenze 10'000) konzentriert.

#### 2.6.3.5 Gelpermeationschromatographie

Für den finalen Reinigungsschritt wurde die konzentrierte GluRS-Lösung mittels einer Superdex 200 10/30 Gelfiltrationssäule (GE Healthcare) aufgetrennt. Die Säule wurde vor dem Auftragen der Probe mit GluRS-GPC-Puffer äquilibriert. Nach der Chromatographie wurden alle GluRS enthaltenden Fraktionen vereinigt und mittels Ultrafiltration (Vivaspin15, Ausschlussgrenze 10'000) auf 580 µl mit einer Proteinkonzentration von 25 mg/ml angereichert. Nach Zusatz von Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 65 % (v/v) wurde die Proteinlösung bei -20 °C gelagert.

#### 2.6.3.6 Lösungen zur Reinigung der *Escherichia coli* Glutamyl-tRNA Synthetase

|                        |                             |            |
|------------------------|-----------------------------|------------|
| GluRS-Aufschlusspuffer | Tris-HCl (pH 7.8)           | 20 mM      |
|                        | Glycerin                    | 10 % (w/v) |
|                        | EDTA                        | 100 µM     |
|                        | DTT                         | 3 mM       |
|                        | Proteaseinhibitor           | ½ Tablette |
|                        | (Complete, Mini, EDTA-free) |            |

|                  |                     |             |
|------------------|---------------------|-------------|
| GluRS-Puffer 1   | Tris-HCl (pH 7.8)   | 20 mM       |
|                  | Glycerin            | 10 % (w/v)  |
|                  | DTT                 | 200 $\mu$ M |
| GluRS-Puffer 2   | Tris-HCl (pH 7.8)   | 20 mM       |
|                  | Glycerin            | 10 % (w/v)  |
|                  | DTT                 | 200 $\mu$ M |
|                  | NaCl                | 1 M         |
| GluRS-GPC-Puffer | HEPES-NaOH (pH 7.2) | 40 mM       |
|                  | DTT                 | 1 mM        |
|                  | Glycerin            | 20 % (w/v)  |

## 2.6.4 Rekombinante Produktion und chromatographische Reinigung der *Escherichia coli* Glutamat-1-semialdehyd-2,1-Aminomutase

### 2.6.4.1 Bakterienkultivierung

Ausgehend von einer Glycerinkultur BL21( $\lambda$ DE3)/pLIpopC-Zellen wurde eine 150 ml Vorkultur (LB-Medium mit 100  $\mu$ g/ml Ampicillin) angeimpft. Von dieser wurden je 5 ml in 500 ml LB-Medium mit 100  $\mu$ g/ml Ampicillin im 1 l Schikanekolben überführt. Die Kulturen wurden bis zu einer OD<sub>578nm</sub> von 0.6 bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Dann wurde die Proteinproduktion durch Zugabe von 400  $\mu$ M IPTG gestartet. Weiterhin wurden zu diesem Zeitpunkt erneut 100  $\mu$ g/ml Ampicillin hinzugefügt. Drei Stunden nach der Induktion wurden die Zellen durch Zentrifugation (Sorvall, RC 5B Plus, SLA 3000, 5'000 rpm; 10 min; 4 °C) geerntet. Das entstandene Zellsediment wurde in 100 mM Tris-HCl (pH 8.0) resuspendiert und in ein 50 ml Plastik-Röhrchen überführt. Nach erneuter Zentrifugation (Eppendorf, Centrifuge 5804, A-4-44, 5'000 rpm; 10 min; 4 °C) wurden die sedimentierten Zellen bei -20 °C gelagert.

### 2.6.4.2 Zellaufschluss

Die sedimentierten Zellen (4 g Nassgewicht) wurden in 20 ml GSA-AM-Puffer A resuspendiert und durch Ultraschall (Bandelin, Sonoplus HD 2070, KE76, 10 min;

0.5 sec Puls; 0.5 sec Pause; 70 % Amplitude) aufgeschlossen. Danach erfolgte die Abtrennung der unlöslichen Zellbestandteile durch Zentrifugation der Suspension in der Ultrazentrifuge (Beckman, L7-65, Ti70.1, 50'000 rpm; 45 min; 4 °C).

#### **2.6.4.3 Anionenaustauschchromatographie an DEAE Sepharose<sup>TM</sup>**

Für die Reinigung der GSA-AM wurde der Überstand zunächst auf eine 25 ml DEAE Sepharose<sup>TM</sup> Fast Flow Säule (XK 16 Säule, GE Healthcare) aufgebracht, die zuvor mit GSA-AM-Puffer A äquilibriert wurde. Anschließend wurde die Säule mit 50 ml GSA-AM-Puffer A gewaschen und die Proteine mit einem linearen Salzgradienten über 150 ml von 0 - 1 M NaCl in GSA-AM-Puffer A eluiert. Die GSA-AM enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt (~200 mg Gesamtprotein) und über Nacht bei 4 °C gegen GSA-AM-Puffer B dialysiert.

#### **2.6.4.4 Anionenaustauschchromatographie an MonoQ**

Im zweiten Reinigungsschritt wurde die dialysierte GSA-AM Lösung (40 ml) auf eine MonoQ HR 10/10 Säule (GE Healthcare), die zuvor mit GSA-AM-Puffer B äquilibriert wurde, aufgebracht. Die Säule wurde zunächst mit 20 ml GSA-AM-Puffer B gewaschen, bevor die Elution der gebundenen Proteine durch einen linearen Salzgradienten über 150 ml von 10 mM - 1 M NaCl in GSA-AM-Puffer B erfolgte. Vor dem abschließenden Reinigungsschritt wurden die GSA-AM enthaltenden Fraktionen vereinigt und durch Ultrafiltration (Vivaspin15, Ausschlussgrenze 10'000) bis zu einem Volumen von 2 ml (45 mg/ml Protein) konzentriert.

#### **2.6.4.5 Gelpermeationschromatographie**

Für den finalen Reinigungsschritt wurde die konzentrierte GSA-AM Lösung mittels einer Superdex 75 (prep grade, high load 26/60) Gelfiltrationssäule (GE Healthcare) aufgetrennt. Die Säule wurde vor dem Auftragen der Probe mit GSA-AM-Puffer C äquilibriert. Nach der Chromatographie wurden alle GSA-AM enthaltenden Fraktionen vereinigt und mittels Ultrafiltration (Vivaspin15, Ausschlussgrenze 30'000) konzentriert. Das erhaltene Konzentrat wurde mit gleichem Volumen 80 %igem (w/v) Glycerin versetzt und in Aliquots (30 mg/ml) bei -20 °C gelagert.

#### 2.6.4.6 Lösungen zur Reinigung der Glutamat-1-semialdehyd-2,1-Aminomutase

|                 |                     |     |    |
|-----------------|---------------------|-----|----|
| GSA-AM-Puffer A | PIPES-NaOH (pH 6.8) | 100 | mM |
|                 | DTT                 | 5   | mM |
|                 | EDTA                | 1   | mM |
| GSA-AM-Puffer B | HEPES-NaOH (pH 7.9) | 20  | mM |
|                 | NaCl                | 10  | mM |
|                 | DTT                 | 5   | mM |
| GSA-AM-Puffer C | HEPES-NaOH (pH 7.9) | 20  | mM |
|                 | NaCl                | 100 | mM |
|                 | DTT                 | 10  | mM |

#### 2.6.5 Dialyse

Zur Entsalzung und Umpufferung wurden die Proteinlösungen bei einem Volumen kleiner als 1 ml in Dialyseknöpfen und bei größeren Volumina in Dialyseschläuchen über Nacht bei 4 °C gegen mindestens 100 Volumenteile des gewünschten Puffers dialysiert. Die Ausschlussgrenze der verwendeten Dialyseschläuche betrug 12 kDa.

#### 2.6.6 Konzentrierung von Proteinlösungen

Zur Konzentrierung von Proteinlösungen wurden je nach Anfangsvolumen Vivaspin4 bzw. Vivaspin15 Ultrafiltrationsmembrankonzentratoren nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Ausschlussgrenzen lagen je nach Protein bei 10 oder 30 kDa.

## 2.7 Proteincharakterisierung

### 2.7.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

#### 2.7.1.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen mittels Photometer

Die Konzentration einer gereinigten Proteinlösung kann bei bekannter Aminosäurezusammensetzung des Proteins mit der Methode von Gill und von Hippel bestimmt werden (Gill & von Hippel, 1989). Die Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Cystein absorbieren bei einer Wellenlänge von 280 nm. Aus der Anzahl dieser Aminosäuren im Protein kann der molare dekadische Extinktionskoeffizient  $\epsilon_{280}$  mit folgender Gleichung berechnet werden:

$$\epsilon_{280} = (n_{\text{Trp}} \cdot 5690 + n_{\text{Tyr}} \cdot 1280 + n_{\text{Cys}} \cdot 120) \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$n_x$  = Anzahl der betreffenden Aminosäuren im Protein

$\epsilon_{280}$  = molarer dekadischer Extinktionskoeffizient bei 280 nm

Mit Hilfe des molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten kann nun die Proteinkonzentration nach Messen der Absorption bei 280 nm berechnet werden:

$$c[\text{mg/ml}] = M_r \cdot A_{280} / \epsilon_{280} \cdot d$$

$d$  = Schichtdicke der Küvette [cm]

$M_r$  = Molekulargewicht des Proteins [g/mol]

$c$  = Proteinkonzentration

$A_{280}$  = Absorption bei 280 nm

#### 2.7.1.2 Proteinbestimmung mittels BioRad Protein Test

Bei Proteinlösungen, die nur geringe Mengen Protein enthielten, wurde zur Konzentrationsbestimmung der BioRad Protein Test verwendet. Der Test beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums einer sauren Coomassie Brilliant Blau G250 Lösung durch Bindung an Proteine von 465 nm zu 595 nm.

Die vollständige Farbreaktion erfolgt bereits 5 min nach der Zugabe des Reagenz und bleibt anschließend für 60 min bei RT stabil. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers nach der „Microassay Procedure“ für 1 - 20 µg Protein. Als Eichgerade wurde entweder eine BSA-Lösung oder eine GluTR-Lösung bekannter Konzentration verwendet.

### 2.7.2 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine unter denaturierenden Bedingungen unabhängig von ihrer ursprünglichen Oberflächenladung nur aufgrund ihrer Molekularmasse in einem elektrischen Feld getrennt (Lämmli, 1970). Eigenladung und Form der Proteine werden durch das Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) weitestgehend aufgehoben, so dass die Proteine denaturiert und einheitlich stark negativ geladen sind. Die Gelmatrix bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE besteht aus einem großporigen Sammelgel (6 % Polyacrylamid) und einem kleinporigen Trenngel (9 oder 12 % Polyacrylamid). Während der Elektrophorese werden die Proteine zunächst an der Grenze zwischen Sammelgel und dem eigentlichen Trenngel fokussiert. Auf diese Weise werden Bandenschärfe und Trennleistung der Elektrophorese erhöht (Righetti *et al.*, 1990).

Die Proteinproben für die Elektrophorese wurden zunächst mit 0.2 - 0.5 Volumen des Probenpuffers versetzt, zur Denaturierung 5 min bei 95 °C erhitzt und zentrifugiert (Eppendorf, MiniSpin, 13'400 rpm, RT). Die Trennung der Proteine erfolgte anschließend bei einer Stromstärke von 45 mA pro Gel. Danach wurden die Gele entweder für den Westernblot (siehe 2.7.3) weiter verwendet oder mit der Färbelösung kurz in der Mikrowelle aufgeköcht und für 30 min unter Schwenken gefärbt. Die Gele wurden anschließend in Entfärbelösung bis zur vollständigen Entfärbung des Hintergrunds inkubiert. Vor der Dokumentation mittels Scanner wurden die Gele in Wasser äquilibriert. Zur weiteren Archivierung wurden die Gele zwischen zwei Cellophanfolien getrocknet.

#### 2.7.2.1 Lösungen zur SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

|                       |              |             |
|-----------------------|--------------|-------------|
| Acrylamid-Stammlösung | Acrylamid    | 30 % (w/v)  |
|                       | Bisacrylamid | 0.8 % (w/v) |

|                      |                          |              |    |
|----------------------|--------------------------|--------------|----|
| Trenngel (9 %)       | Acrylamid-Stammlösung    | 1.5          | ml |
|                      | 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)  |              |    |
|                      | mit 0.4 % (w/v) SDS      | 1.25         | ml |
|                      | dest. Wasser             | 2.175        | ml |
|                      | APS (10 %)               | 75           | µl |
|                      | TEMED                    | 7.5          | µl |
| Trenngel (12 %)      | Acrylamid-Stammlösung    | 2            | ml |
|                      | 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)  |              |    |
|                      | mit 0.4 % (w/v) SDS      | 1.25         | ml |
|                      | dest. Wasser             | 1.75         | ml |
|                      | APS (10 %)               | 50           | µl |
|                      | TEMED                    | 5            | µl |
| Sammelgel            | Acrylamid-Stammlösung    | 500          | µl |
|                      | 500 mM Tris-HCl (pH 6.8) |              |    |
|                      | mit 0.4 % (w/v) SDS      | 625          | µl |
|                      | dest. Wasser             | 1.375        | ml |
|                      | APS (10 %)               | 25           | µl |
|                      | TEMED                    | 2.5          | µl |
| Elektrophoresepuffer | Glycin                   | 380          | mM |
|                      | Tris                     | 50           | mM |
|                      | SDS                      | 0.1 % (w/v)  |    |
| SDS-Probenpuffer     | Tris-HCl (pH 6.8)        | 100          | mM |
|                      | Glycerin                 | 40 % (v/v)   |    |
|                      | β-Mercaptoethanol        | 10 % (v/v)   |    |
|                      | SDS                      | 3.2 % (w/v)  |    |
|                      | Bromphenolblau           | 0.2 % (w/v)  |    |
| Färbelösung          | Essigsäure               | 10 % (v/v)   |    |
|                      | Ethanol                  | 30 % (v/v)   |    |
|                      | Brilliant Blau           | 0.25 % (w/v) |    |

|                |            |            |
|----------------|------------|------------|
| Entfärbelösung | Ethanol    | 30 % (v/v) |
|                | Essigsäure | 10 % (v/v) |

### 2.7.3 Westernblotanalyse

Bei diesem Verfahren werden Proteine aus einem Polyacrylamidgel (siehe 2.7.2) mittels Elektrottransfer auf eine PVDF-Membran übertragen. Auf dieser Membran können sie anschließend spezifisch mit Antikörpern detektiert werden oder für die N-terminale Sequenzierung weiterverwendet werden. Für den Nachweis der Proteine wird zunächst ein primärer Antikörper eingesetzt, der spezifisch gegen das gewünschte Protein gerichtet ist. Der primäre Antikörper kann nun mit Hilfe eines sekundären Antikörpers detektiert werden. Dabei ist der sekundäre Antikörper von breiterer Spezifität, da er meist gegen den Fc-Teil des ersten Antikörpers gerichtet ist. Somit kann der sekundäre Antikörper zur Detektion aller Antikörper einer Spezies eingesetzt werden. Weiterhin ist der sekundäre Antikörper meistens mit einem Enzym konjugiert, welches eine detektierbare Reaktion katalysiert. In dieser Arbeit wird der sekundäre Antikörper aus Ziege gegen Kaninchen IgG verwendet, da beide eingesetzten primären Antikörper in Kaninchen produziert wurden. Dieser verwendete sekundäre Antikörper ist mit der alkalischen Phosphatase konjugiert, die durch Reaktion mit 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP) und Nitroblau-Tetrazolium (NBT) einen wasserunlöslichen, blauen Farbstoff bildet.

Für den Westernblot werden zunächst Gel, Blotpapier und die in Methanol äquilibrierte und in Wasser gewaschene PVDF-Membran für 15 min in Towbin-Puffer äquilibriert und die Proteine entweder im „Semidry“-Verfahren für 30 min bei 10 V oder im „Tank-Blot“-Verfahren für 1 h bei 1.5 A auf die Membran übertragen. Anschließend wurden die Proteine auf der Blotmembran für etwa 5 min in PonceauS-Lösung (1:5 verdünnt) reversibel gefärbt und dann mit Wasser solange entfärbt, bis die Proteinbanden sichtbar wurden. Nach vollständiger Entfärbung wurden die noch freien Proteinbindungsstellen der Membran mit BSA abgesättigt (Inkubation der Membran über Nacht bei RT in Blockierlösung), um unspezifische Bindungen der Antikörper an die Membran zu minimieren. Die Membran wurde dann dreimal für 5 min in PBS gewaschen und mit dem primären Antikörper (anti-GluTR 1:30'000 oder anti-GSA-AM 1:30'000 in PBS mit 3 % BSA (w/v)) für 2 h inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Membran für je



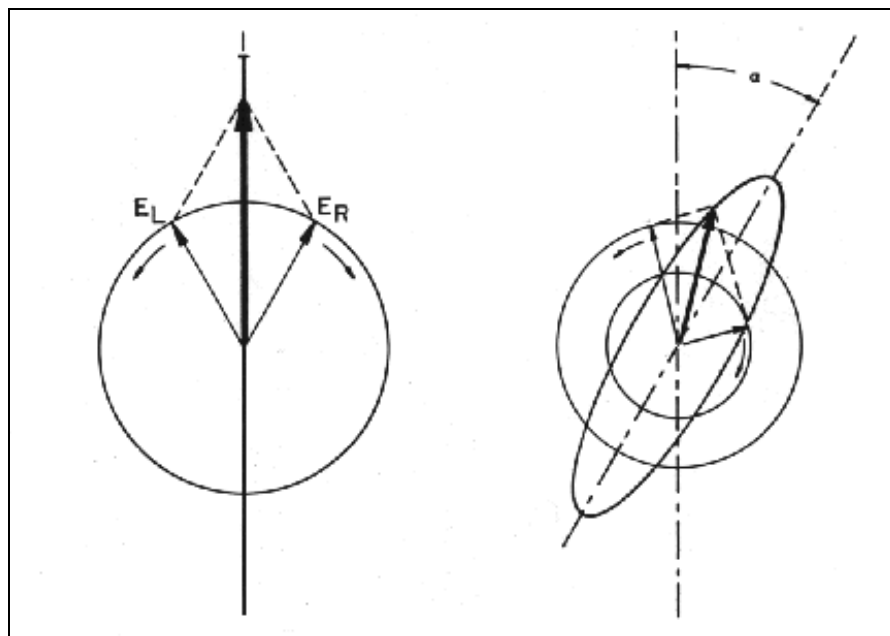
5 min in PBS erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (goat-anti-rabbit IgG 1:20'000 in PBS mit 3 % BSA (w/v)) für 1 - 2 h. Anschließend wurde die Membran zunächst dreimal für je 5 min in PBS, dann einmal in Alkalischem Phosphatase Puffer gewaschen, bevor die Entwicklerlösung auf die Membran gegeben wurde. Die Membran wurde bis zum Sichtbarwerden der Banden in der Entwicklerlösung belassen und anschließend mit Wasser gewaschen, um eine weitere Farbreaktion zu unterbrechen.

### 2.7.3.1 Lösungen für den Westernblot

|                                        |                                  |     |       |
|----------------------------------------|----------------------------------|-----|-------|
| Towbin-Puffer                          | Tris                             | 25  | mM    |
|                                        | Glycin<br>(pH 8.3)               | 192 | mM    |
| PonceauS-Lösung                        | PonceauS                         | 0.4 | g     |
|                                        | TCA                              | 6   | g     |
|                                        | Sulfosalicylsäure                | 6   | g     |
|                                        | H <sub>2</sub> O                 | 20  | ml    |
| PBS                                    | NaCl                             | 137 | mM    |
|                                        | KCl                              | 2.2 | mM    |
|                                        | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 10  | mM    |
|                                        | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | 1.7 | mM    |
|                                        | pH 7.4 mit HCl eingestellt       |     |       |
| Blockierlösung                         | BSA in PBS                       | 5 % | (w/v) |
| Alkalische Phosphatase<br>Puffer (APB) | Tris-HCl (pH 9.5)                | 100 | mM    |
|                                        | NaCl                             | 100 | mM    |
|                                        | MgCl <sub>2</sub>                | 5   | mM    |
| Entwicklerlösung                       | APB                              | 20  | ml    |
|                                        | NBT (50 mg/ml in 70 % DMF)       | 132 | µl    |
|                                        | BCIP (50 mg/ml in DMF)           | 60  | µl    |

### 2.7.4 Messungen mittels Cirkulärem Dichroismus (CD)

Die CD-Spektroskopie ist eine Form der Absorptionsspektroskopie, in der die unterschiedlichen Absorptionen von rechts- und links-gerichtet-cirkular-polarisiertem Licht, das durch eine optisch aktive Substanz verursacht wurde, gemessen wird. Dafür wird eine linear polarisierte Strahlung in die zwei cirkular polarisierten Anteile aufgespalten und durch die Probe gelenkt. Wenn nun einer der beiden Anteile stärker durch die Probe absorbiert wird als der andere, entsteht bei der nachfolgenden Vereinigung der Anteile eine elliptisch polarisierte Strahlung (wenn keiner der beiden Teile absorbiert wird, entsteht wieder die linear polarisierte Strahlung) (Abbildung 12). Das CD-Spektrum wird erstellt, indem dieser Dichroismus als Funktion der Wellenlänge aufgezeichnet wird (Kelly & Price, 1997).



**Abbildung 12: Grundlage zur Entstehung von CD-Spektren.**

Links: die links und rechts polarisierten Komponenten werden nicht absorbiert, die resultierende Strahlung ist wieder eben polarisiert.

Rechts: durch stärkere Absorption einer der beiden Komponenten ist die resultierende Strahlung elliptisch polarisiert.

Anhand von CD-Spektren können verschiedene Eigenschaften von Proteinen bestimmt werden. So können im fernen UV-Bereich (240 bis 180 nm) Aussagen über die Sekundärstruktur des Proteins gemacht werden, da in diesem Bereich die Peptidbindung die absorbierende Gruppe ist. Ein Beispiel hierfür ist die Abschätzung des Gehalts an  $\alpha$ -helikalen Bereichen, da diese in CD-Spektren charakteristische Minima bei Wellenlängen von 208 und 220 nm aufweisen. Die Elliptizität bei 220 nm wird

signifikant durch die Länge der  $\alpha$ -Helices und der Dynamik des Proteins beeinflusst. Im nahen UV-Bereich (250 bis 290 nm) absorbieren die Seitenketten der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan, die durch die Tertiärstruktur des Proteins in asymmetrische Umgebung versetzt werden, und die CD-Spektren so verschiedene für das Protein charakteristische Merkmale aufweisen.

In dieser Arbeit wurde die korrekte Faltung der GluTR-Varianten anhand vergleichender CD-Spektren mit dem Wildtyp-Enzym überprüft. Zu diesem Zweck wurden je 500  $\mu$ l einer Proteinlösung (500  $\mu$ g/ml) über Nacht bei 4 °C gegen 100 ml CD-Puffer dialysiert. Die dialysierten Proteinlösungen wurden im J-810 Spectropolarimeter von 180 bis 250 nm bei RT vermessen.

#### 2.7.5.1 Lösungen für die CD-Spektroskopie

|           |                   |    |    |
|-----------|-------------------|----|----|
| CD-Puffer | Tris-HCl (pH 8.0) | 20 | mM |
|           | NaCl              | 10 | mM |

## 2.8 Glutamyl-tRNA Reduktase Aktivitätstest

### 2.8.1 Herstellung der Substrate für die Glutamyl-tRNA Reduktase

#### 2.8.1.1 Glutamyl-tRNA<sup>Glu</sup>

Für die Aktivitätstests der GluTR wurde ihr natürliches Substrat Glutamyl-tRNA benötigt und in der folgenden Weise hergestellt. Zur Aminoacylierung von 100 - 200  $\mu$ g *E. coli* tRNA<sup>Glu</sup> wurde die tRNA<sup>Glu</sup> (Sigma) in einem Ansatz mit 4 mM ATP und 35  $\mu$ M [<sup>14</sup>C]Glutamat (10  $\mu$ Ci) in einem Volumen von 1 ml in GluRS-Assay-Puffer für 20 min bei 37 °C und 500 rpm inkubiert. Der Reaktionsstart erfolgte durch die Zugabe von 500 nM GluRS und durch die Erwärmung des Ansatzes auf 37 °C.

#### 2.8.1.2 Glutaminyl-tRNA<sup>Glu</sup>

Für die Untersuchungen zur Substraterkennung der GluTR wurde als künstliches Substrat die tRNA<sup>Glu</sup> mit Glutamin fehlbeladen. Um die Bedingungen zu finden, bei

denen die tRNA<sup>Glu</sup> durch enzymatische Reaktion der GluRS bzw. der GlnRS mit Glutamin beladen wird, wurden in den Ansätzen die tRNA-Konzentration (1 - 10 µM), die [<sup>14</sup>C]Glutamin-Konzentration (25 - 35 µM), die Konzentration des Enzyms (500 nM - 100 µM) sowie die Inkubationszeit bei 37 °C (20 - 240 min) variiert.

### 2.8.1.3 Lösungen zur Substratherstellung

|                    |                   |    |    |
|--------------------|-------------------|----|----|
| GluRS-Assay-Puffer | HEPES (pH 7.0)    | 50 | mM |
|                    | MgCl <sub>2</sub> | 15 | mM |
|                    | KCl               | 25 | mM |
|                    | DTT               | 3  | mM |

### 2.8.2 Reinigung aminoacylierter tRNA

Die Reinigung der markierten Substrate *E. coli* [<sup>14</sup>C]Glu-tRNA<sup>Glu</sup> und [<sup>14</sup>C]Gln-tRNA<sup>Glu</sup> erfolgte durch die Extraktion des Reaktionsansatzes mit einem Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol-Gemisch (25:24:1) (PCI) in 10 ml Plastik-Gefäßen. Um die Hydrolyse der Aminoacylbindung während der Aufarbeitung zu verhindern, wurde mit H<sub>2</sub>O gesättigtes Phenol mit einem pH-Wert von 4.5 - 5.0 verwendet. Alle Schritte wurden mit eiskühlten Lösungen und so zügig wie möglich durchgeführt.

Der Reaktionsansatz (1 ml) wurde zunächst mit 4 ml 375 mM Natriumacetat (pH 5.2) versetzt, gemischt, dieses dann für die Extraktion zu 5 ml PCI gegeben und kräftig geschüttelt. Durch Zentrifugation (Eppendorf, Centrifuge 5403, A-4-44, 1 min; 5'000 rpm; 4 °C) erfolgte die Phasentrennung. Die obere (wässrige) Phase wurde zur weiteren Extraktion mit 5 ml Chloroform versetzt und erneut kräftig gemischt (Abtrennung letzter Phenolreste und denaturierter Proteine). Nach wiederholter Zentrifugation wurde die wässrige Phase abgenommen und auf 10 Eppendorfreaktionsgefäße (2 ml) verteilt. Anschließend erfolgte die Fällung der aminoacylierten tRNA durch Zugabe von 3 Volumenteilen Ethanol. Die gefällte tRNA wurde durch Zentrifugation (Heraeus, Biofuge pica, 13'200 rpm; 25 min; 4 °C) geerntet. Der Überstand wurde abgenommen und die tRNA durch 5 - 10 min Vakuumzentrifugation in der SpeedVac<sup>®</sup> getrocknet. Die getrocknete tRNA wurde in 30 - 100 µl 30 mM Natriumacetat (pH 4.9) aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

### 2.8.3 Glutamyl-tRNA Reduktase Aktivitätstest (Depletionstest)

Bei dem verwendeten GluTR-Enzymtest wird die Abnahme des Substrats [ $^{14}\text{C}$ ]Glu-tRNA<sup>Glu</sup> bzw. [ $^{14}\text{C}$ ]Gln-tRNA<sup>Glu</sup> verfolgt. Der Test beruht auf der Präzipitation des [ $^{14}\text{C}$ ]-markierten Substrats und der anschließenden Quantifizierung durch Szintillationszählung (Hoben & Söll, 1985).

Für den generellen Test auf Aktivität wurden in einem 80  $\mu\text{l}$  Ansatz 300  $\mu\text{g/ml}$  BSA, 2 mM NADPH und verschiedene Mengen (100 nM - 1  $\mu\text{M}$ ) *E. coli* GluTR in GluTR-Assay-Puffer für 45 sec bei 37 °C inkubiert. Der Reaktionsstart erfolgte danach durch Zugabe von Substrat in 2 - 10 fachem molaren Überschuss zum Enzym (500 nM - 2  $\mu\text{M}$ ). Anschließend wurde der Ansatz weiter bei 37 °C und 500 rpm inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten (meist 10, 40, 70 und 100 sec) je 15  $\mu\text{l}$  Proben genommen. Diese wurden auf einen halbierten Whatman 3MM-Filter pipettiert und zum Abstoppen der Reaktion zügig in 10 % TCA überführt. Zur Abtrennung von freiem [ $^{14}\text{C}$ ]Glu und [ $^{14}\text{C}$ ]GSA wurden die Filter innerhalb von 15 min bei RT erneut in 10 % TCA, dann in 5 % TCA und zuletzt in Ethanol gewaschen und anschließend für 15 min getrocknet. Die trockenen Filter wurden dann in 4 ml Szintillationsflüssigkeit (OptiPhase HiSafe 2) überführt und die Proben für jeweils 20 min im Zählgerät ausgezählt.

Um die Aktivität der GluTR auch mit der misacylierten [ $^{14}\text{C}$ ]Gln-tRNA<sup>Glu</sup> bestimmen zu können und die verschiedenen GluTR-Mutanten besser miteinander vergleichen zu können, wurden die Volumina der Reaktionsansätze auf 15  $\mu\text{l}$  reduziert. Je nach Aktivität der verwendeten Mutanten enthielten diese Ansätze 5.7 nM - 1  $\mu\text{M}$  GluTR, 25  $\mu\text{g}$  BSA und 2 mM NADPH in GluTR-Assay-Puffer. Die Ansätze wurden analog zu den 80  $\mu\text{l}$  Ansätzen für 45 sec bei 37 °C inkubiert, bevor die Reaktion durch Zugabe von 100 nM Substrat ([ $^{14}\text{C}$ ]Glu-tRNA<sup>Glu</sup> oder [ $^{14}\text{C}$ ]Gln-tRNA<sup>Glu</sup>) gestartet wurde. Nach 10 sec wurde der gesamte Ansatz wie oben beschrieben abgestoppt und analysiert. Je GluTR-Variante wurden vier Enzymkonzentrationen in dreifacher Wiederholung analysiert. Die Aktivität wurde dabei als Verhältnis von Geschwindigkeit zur Enzymkonzentration bestimmt (Eisenthal & Danson, 2002).

### 2.8.3.1 Lösungen für den Glutamyl-tRNA Reduktase Aktivitätstest

|                    |                   |    |    |
|--------------------|-------------------|----|----|
| GluTR-Assay-Puffer | HEPES (pH 8.1)    | 50 | mM |
|                    | MgCl <sub>2</sub> | 20 | mM |
|                    | KCl               | 20 | mM |
|                    | DTT               | 3  | mM |

### 2.8.4 Identifizierung der Glutamyl-tRNA Reduktase Reaktionsprodukte mittels HPLC

Der Aktivitätstest der GluTR verfolgt nur die Abnahme des Substrats, ohne dabei die gebildeten Reaktionsprodukte zu identifizieren. Neben der Reduktase-Aktivität, bei der GSA gebildet wird, besitzt die GluTR auch eine Esterase-Aktivität, wobei Glutamat freigesetzt wird (Moser *et al.*, 1999). Zur Unterscheidung dieser beiden möglichen Reaktionsprodukte wird die Reversed-Phase-Chromatographie genutzt. Mit Hilfe einer Waters  $\mu$ Bondapak<sup>TM</sup> C<sub>18</sub>-Säule (3.9 x 150 mm, 125 Å Porengröße, 10  $\mu$ m Partikeldurchmesser) können Glutamat, GSA und ALA getrennt und somit eindeutig identifiziert werden.

Für die Analyse der gebildeten Reaktionsprodukte wurden die Ansätze, analog zu **2.8.3**, für 15 min bei 37 °C inkubiert. Zur Überführung von GSA in ALA wurden die Reaktionsgemische (15 - 20  $\mu$ l) mit 2  $\mu$ l (10 mM) PLP und 1  $\mu$ l GSA-AM (7.7 mg/ml) versetzt und für weitere 15 min bei 37 °C und 500 rpm inkubiert. Die Ansätze wurden im Folgenden mit Wasser auf 90  $\mu$ l aufgefüllt. Zur Fällung der Proteine und der tRNA wurden 10  $\mu$ l 10 % Perchloressigsäure hinzugefügt, geschüttelt und die Proben für 15 min auf Eis belassen. Anschließend wurden die Ansätze bei 4 °C für 30 min (Heraeus, Biofuge pica, 13'200 rpm) zentrifugiert. Der so erhaltene Überstand wurde abgenommen und für die HPLC in Probengefäße überführt.

Je Probe wurden 40  $\mu$ l auf die Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte mit HPLC-Puffer bei einem Druck von ca. 50 bar und einer Flussrate von 1 ml/min. Die radioaktiven Substanzen wurden dabei mit einem Durchfluss-Szintillationszähler (Ramona 2000, Raytest) detektiert. Vorherige Eichläufe mit reinem [<sup>14</sup>C]Glu und [<sup>14</sup>C]ALA unter identischen Bedingungen dienten zur Ermittlung der Retentionszeiten.

#### 2.8.4.1 Lösungen für die HPLC

|             |                                              |     |       |
|-------------|----------------------------------------------|-----|-------|
| HPLC-Puffer | NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 3.0 mit | 50  | mM    |
|             | Phosphorsäure eingestellt)                   |     |       |
|             | SDS                                          | 5   | mM    |
|             | Tert-Amylalkohol                             | 1 % | (v/v) |

#### 2.8.5 Bestimmung der GluTR-Esterase-Aktivität mittels 4-Nitrophenylacetat

Zur Bestimmung der Esterase-Aktivität der GluTR wurde bisher der Depletionstest (siehe 2.8.3) in Abwesenheit des Cofaktors NADPH verwendet. Für Esterasen gibt es eine Reihe von Testsystemen, welche auf der enzymatischen Hydrolyse des 4-Nitrophenylacetats beruhen (Baltzer *et al.*, 1999). Die Bildung des dabei entstehenden Nitrophenols kann leicht photometrisch verfolgt werden. Mit Hilfe des 4-Nitrophenylacetats wurde nun auch die GluTR-Esterase-Aktivität ermittelt.

Die 600 µl Reaktionsansätze enthielten 590 µl Nitrophenol-Assay-Puffer und 5 µl einer 192 mM 4-Nitrophenylacetat Lösung (hergestellt ausgehend von einer 243 mM Stammlösung in Acetonitril). Um die Reaktion zu starten, wurden nach 1 min Inkubation bei RT 5 µl einer 19.2 µM GluTR-Lösung hinzugegeben. Die Ansätze wurden gut durchmischt und die Nitrophenolbildung wurde über 10 min bei einer Wellenlänge von 400 nm spektroskopisch beobachtet.

##### 2.8.5.1 Lösungen für die Bestimmung der GluTR-Esterase-Aktivität mittels 4-Nitrophenylacetat

|                          |                     |      |       |
|--------------------------|---------------------|------|-------|
| Nitrophenyl-Assay-Puffer | HEPES-NaOH (pH 8.1) | 50   | mM    |
|                          | MgCl <sub>2</sub>   | 20   | mM    |
|                          | KCl                 | 20   | mM    |
|                          | DTT                 | 3    | mM    |
|                          | Glycerin            | 20 % | (w/v) |

## 2.9 Protein-Protein-Wechselwirkungsstudien

### 2.9.1 Co-Immunopräzipitation

Durch Co-Immunopräzipitation können Protein-Protein-Wechselwirkungen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesen werden. Dabei werden die zu untersuchenden Proteingemische zunächst mit dem Antikörper gegen einen der Interaktionspartner inkubiert. Die entstandenen Antikörper-Antigen Komplexe werden mit Hilfe von Protein A Sepharose präzipitiert. Anschließend kann im Falle einer Interaktion der untersuchten Proteine, der co-präzipitierte Interaktionspartner spezifisch in einem Westernblot mittels gegen ihn gerichteten Antikörpern detektiert werden. Die für diese Methode benötigten Antikörper gegen die *E. coli* GluTR und die *E. coli* GSA-AM wurden ausgehend von rekombinant produzierten und gereinigten Enzymen von der Firma Eurogentec (Belgien) durch Immunisierung von Kaninchen hergestellt (Schauer, 2003).

### 2.9.2 Entfernung von unspezifischen Antikörpern aus dem Kaninchen anti-GluTR Serum

Das anti-GluTR Serum detektiert nicht nur spezifisch die GluTR, sondern reagiert zusätzlich mit sehr vielen *E. coli* Proteinen. Um die unspezifischen Antikörper aus dem Serum zu entfernen, wurde der *hemA*-defiziente *E. coli* Stamm EV61 verwendet. Es wurden Zellen einer 20 ml Übernachtskultur zunächst zentrifugiert (Sorvall, RC 5B Plus, SS34, 8'000 rpm; 10 min; 4 °C) und in 20 ml 0.9 % (w/v) NaCl-Lösung resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (Sorvall, RC 5B Plus, SS34, 8'000 rpm; 10 min; 4 °C) wurden die Zellen in 5 ml Towbin-Puffer (siehe 2.7.3.1) resuspendiert und für 5 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden zentrifugiert (Sorvall, RC 5B Plus, SS34, 8'000 rpm; 10 min; 4 °C) und das Sediment wurde in 1 ml Towbin-Puffer resuspendiert, um die Zellen in ein 1.5 ml Eppendorfreaktionsgefäß zu überführen. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (Eppendorf, MiniSpin, 13'400 rpm; 5 min; RT) erneut sedimentiert, mit 1 ml CHCl<sub>3</sub> versetzt, für 1 min kräftig geschüttelt und für weitere 5 min zentrifugiert (Eppendorf, MiniSpin, 13'400 rpm; RT). Die über der Chloroform-Phase befindliche Substanz wurde isoliert und zweimal mit je 1 ml 0.9 % (w/v) NaCl-Lösung gewaschen. Das Sediment wurde mit 200 µl Kaninchen anti-GluTR Serum für



10 min bei 37 °C inkubiert. Nach der Zentrifugation (Eppendorf, MiniSpin, 13'400 rpm; 1 min, RT) wurde der klare Serumüberstand abgenommen und portioniert bei -20 °C gelagert.

### 2.9.3 *In vivo* Co-Immunopräzipitation

Für den *in vivo* Nachweis des GluTR/GSA-AM Komplexes wurden *E. coli* BL21(λDE3)-Zellen aus 500 ml Kultur sedimentiert, in 5 - 10 ml Aufschlusspuffer resuspendiert und durch Ultraschall (Bandelin, Sonoplus HD 2070, KE76, 4 min, 0.5 sec Puls, 0.5 sec Pause, 70 % Amplitude) unter externer Eiskühlung aufgeschlossen. Der Zellextrakt wurde anschließend zentrifugiert (Beckman, L7-65, Ti70.1, 40'000 rpm; 30 min; 4 °C). Je 300 µl des zellfreien Extrakts wurden mit 2.5 µl des entsprechenden Serums (Kaninchen anti-GluTR oder Kaninchen anti-GSA-AM) versetzt und für 90 min bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden je Ansatz 15 µl einer 1:1 Aufschlammung von Protein A Sepharose in Aufschlusspuffer zugegeben und für weitere 90 min bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Nach der Zentrifugation der Ansätze für 60 sec bei 13'400 rpm und 4 °C (Eppendorf, MiniSpin) wurden die Sedimente dreimal mit je 300 µl Waschpuffer gewaschen. Um dabei möglichst wenig Protein A Sepharose zu verlieren, wurden die Überstände mit Hilfe einer 1 ml Spritze mit Kanüle (0.55 x 25 mm) abgenommen. Die gewaschenen, präzipitierten Antikörper-Protein Komplexe wurden mit je 15 µl SDS-Probenpuffer versetzt und wie unter 2.7.2 beschrieben über diskontinuierliche SDS-PAGE mit 9 %igen Trenngelen aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen und mittels Antikörpern detektiert (siehe 2.7.3).

### 2.9.4 *In vitro* Co-Immunopräzipitation

Analog zu der *in vivo* Co-Immunopräzipitation kann die Komplexbildung auch *in vitro* mit rekombinant produzierten und gereinigten Proteinen nachgewiesen werden. Dafür wurden je 1 µM Wildtyp-GluTR bzw. die GluTRA338Stop-Variante mit 1 µM GSA-AM in einem Endvolumen von 100 µl in Assay-Puffer bei 4 °C für 10 min oder bei 37 °C für 2 min vorinkubiert. Diese Ansätze wurden bei Bedarf mit folgenden Zusätzen versehen: 500 µM L-Glutamat, 4 mM ATP, 2 mM NADPH, 500 µM PLP, 1 µM GluRS und 20 µM tRNA<sup>Glu</sup>. Anschließend wurden die Ansätze mit je 300 µl Assay-Puffer

verdünnt, mit 1 µl des entsprechenden Serums (Kaninchen anti-GluTR oder Kaninchen anti-GSA-AM) versetzt und für 30 min unter Schütteln bei 4 °C inkubiert. Die weitere Aufarbeitung der Ansätze erfolgte wie unter **2.9.3** beschrieben.

### 2.9.5 Lösungen für die Co-Immunopräzipitation

|                  |                     |        |       |
|------------------|---------------------|--------|-------|
| Aufschlusspuffer | Tris-HCl (pH 8.0)   | 50     | mM    |
|                  | NaCl                | 150    | mM    |
|                  | DTT                 | 10     | mM    |
|                  | NP-40               | 0.5 %  | (v/v) |
| Waschpuffer      | Tris-HCl (pH 8.0)   | 50     | mM    |
|                  | NaCl                | 150    | mM    |
|                  | EDTA                | 1      | mM    |
|                  | NP-40               | 0.1 %  | (v/v) |
| Assay-Puffer     | HEPES-NaOH (pH 8.0) | 50     | mM    |
|                  | NaCl                | 150    | mM    |
|                  | DTT                 | 5      | mM    |
|                  | MgCl <sub>2</sub>   | 10     | mM    |
|                  | Glycerin            | 10 %   | (v/v) |
|                  | BSA                 | 0.1 %  | (w/v) |
|                  | Tween 20            | 0.05 % | (v/v) |

### 2.9.6 Bestimmung der Komplex-Bindungskonstante mittels der Hummel/Dreyer Methode

Die Hummel/Dreyer Methode wurde ursprünglich zur Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen Makromolekülen und Substanzen mit geringem Molekulargewicht entwickelt (Hummel & Dreyer, 1962). Ein großer Vorteil dieser Methode ist die Möglichkeit, die Anzahl der Bindungsstellen und die Bindungskonstanten selbst bei sehr geringen Affinitäten bestimmen zu können. Dabei sind die Bindungskonstanten, die durch die Hummel/Dreyer Methode gewonnen werden, vergleichbar mit den Bindungskonstanten anderer Methoden. Mittlerweile

existieren auch einige Beispiele, bei denen die Hummel/Dreyer Methode für die Analyse von Protein-Protein-Wechselwirkungen erfolgreich angewandt wurde (Gegner & Dahlquist, 1991).

Die Hummel/Dreyer Methode basiert auf einer Gleichgewichts-Säulenchromatographie. Dabei wird zunächst eine Gelfiltrationssäule mit dem Liganden äquilibriert. Anschließend wird der Bindungspartner zusammen mit der auf der Säule vorhandenen Ligandenkonzentration injiziert. Durch Interaktion zwischen Ligand und Bindungspartner wird der Ligand in seiner Mobilität durch die nun höhere Masse des Komplexes gebremst und es entsteht ein Absorptionstal an der Elutionsposition des Liganden. Unter diesen Bedingungen befinden sich der Bindungspartner und der Komplex im Gleichgewicht mit dem Liganden.

Für die Hummel/Dreyer Analyse wurde eine analytische Superdex 200 (PC 3.2/30) Gelfiltrationssäule der Firma GE Healthcare verwendet. Die Säule wurde zunächst in Hummel/Dreyer-Puffer mit verschiedenen GSA-AM Konzentrationen (5 - 20  $\mu$ M) äquilibriert. Anschließend wurden je 20  $\mu$ l der gewünschten Probe (2 - 20  $\mu$ M GluTR in Hummel/Dreyer-Puffer mit der auf der Säule vorhandenen GSA-AM Konzentration) injiziert, mit einer Flussrate von 100  $\mu$ l/min chromatographiert und die Proteinkonzentration bei einer Wellenlänge von 280 nm aufgezeichnet.

### 2.9.7 Lösungen für die Hummel/Dreyer Analyse

|                      |                     |     |    |
|----------------------|---------------------|-----|----|
| Hummel/Dreyer-Puffer | HEPES-NaOH (pH 8.0) | 50  | mM |
|                      | NaCl                | 150 | mM |
|                      | DTT                 | 5   | mM |

### 3. Ergebnisse und Diskussion

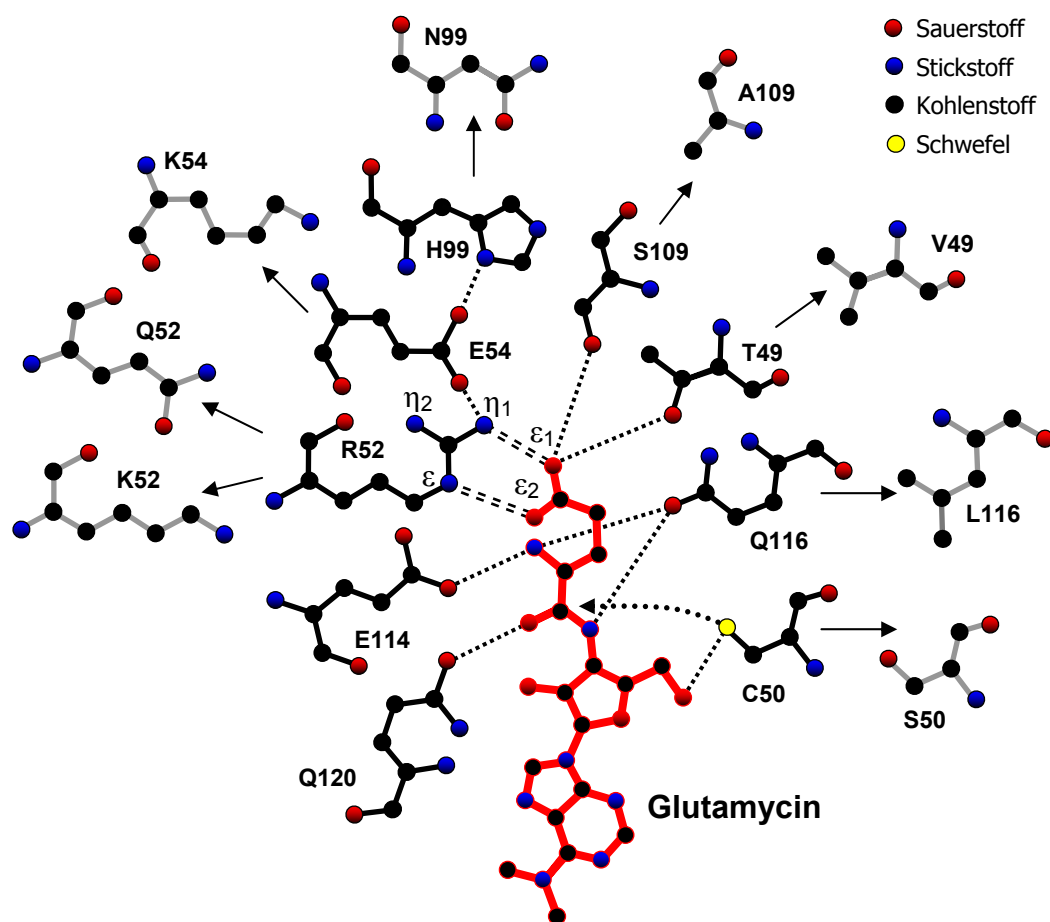
Im ersten Teil der Arbeit sollte die Substraterkennung der GluTR auf Ebene der Aminosäurereste im aktiven Zentrum des Enzyms und der Determinanten des Substrats selbst bestimmt werden. Im zweiten Teil der Arbeit ging es um den Nachweis eines GluTR/GSA-AM-Komplexes.

#### 3.1 Substraterkennung durch die *Escherichia coli* Glutamyl-tRNA Reduktase

Die GluTR gehört zu den wenigen Proteinen, die eine aminoacylierte tRNA als Substrat außerhalb der Proteinbiosynthese verwenden. Somit besitzt die Glu-tRNA<sup>Glu</sup> eine Doppel-Funktion im Metabolismus von vielen Organismen und wird infolgedessen von zwei verschiedenen Enzymen, der GluRS und der GluTR, erkannt. Um die Genauigkeit der Proteinbiosynthese und gleichzeitig den adäquaten metabolischen Fluss hin zur Tetrapyrrolbiosynthese zu gewährleisten, muss die korrekte Erkennung der Glu-tRNA<sup>Glu</sup> durch die GluRS und die GluTR sichergestellt werden.

Die Interaktion zwischen der GluTR und dem tRNA-Teil des Substrats wurde vor kurzem detailliert untersucht (Randau *et al.*, 2004). Es konnte gezeigt werden, dass die einzigartige Kernstruktur der tRNA<sup>Glu</sup> essentiell für die Erkennung durch die GluTR ist. Zur Bestimmung der besonderen strukturellen Merkmale der Glu-tRNA<sup>Glu</sup>, welche für die Erkennung durch die GluTR erforderlich sind, wurden verschiedene Glutamatanaloga (L- und D-Glutamat, DOVA, DAVA und Glutarsäure) in Inhibitionsexperimenten verwendet (Moser *et al.*, 1999). Jedoch konnte bei keiner der getesteten Substanzen eine Inhibierung der Enzymaktivität beobachtet werden. Aus diesen Untersuchungen wurde abgeleitet, dass eine intakte chemische Bindung zwischen Glutamat und dem tRNA-Teil des Substrats für eine effiziente Substraterkennung benötigt wird. In einem groß angelegten Inhibitorscreen (Loida *et al.*, 1999) wurden drei Substanzen identifiziert, die eine inhibitorische Wirkung auf die GluTR ausüben. Da diese jedoch keinerlei strukturelle Ähnlichkeiten mit dem Substrat besaßen, erlaubten die Ergebnisse keine Aussagen bezüglich der Substraterkennung durch die GluTR.

Erste Hinweise zur Erkennung des Glutamat-Teils des tRNA-Substrats lieferte die Struktur der GluTR aus *M. kandleri*, die mit dem Substratanalogon und schwachen Inhibitor Glutamycin co-kristallisiert wurde. Das vom Puromycin abgeleitete Glutamycin imitiert die aminoacylierte tRNA<sup>Glu</sup> (Abbildung 11) und wurde im aktiven Zentrum der GluTR-Kristallstruktur gebunden. Da das Glutamat im Glutamycin nicht über eine hydrolysierbare Esterbindung, sondern über eine stabilere Amidbindung verknüpft ist, kann es von der GluTR nicht umgesetzt werden und stellt somit einen kompetitiven Inhibitor dar.



**Abbildung 13: Modell des aktiven Zentrums der *Escherichia coli* Glutamyl-tRNA Reduktase mit dem Inhibitor Glutamycin.**

Dieses Modell wurde basierend auf den Daten der Kristallstruktur der GluTR aus *M. kandleri* erstellt und unter Berücksichtigung des strukturbasierenden Sequenzalignments auf die GluTR aus *E. coli* übertragen. Der Glutamat-Anteil des Glutamycins (rote Bindungen) wird durch ein Netzwerk aus spezifischen Wasserstoffbrücken (gepunktete Linien) und eine zweifache Salzbrücke (doppelt gestrichelte Linien) erkannt. Der erste Schritt der GluTR-Katalyse, der nukleophile Angriff von Cystein 50 auf den Carbonyl-Kohlenstoff, ist angedeutet (gepunkteter Pfeil). Durchgehende Pfeile zeigen die ausgetauschten Aminosäurereste, die in dieser Arbeit analysiert wurden (graue Bindungen).

In der Kristallstruktur der *M. kandleri* GluTR liegt das Glutamycin gebunden in einer hoch konservierten Bindungstasche vor. Aufgrund der Übereinstimmung der katalytischen und strukturellen Merkmale sowie der hohen Sequenzidentität von 35 % zwischen der *M. kandleri* und der *E. coli* GluTR konnte die dreidimensionale Struktur des *E. coli* Enzyms modelliert werden und so ein Modell des aktiven Zentrums der *E. coli* GluTR erstellt werden (Abbildung 13).

Der Glutamat-Teil des Substrats wird dabei spezifisch über ein hoch konserviertes Wasserstoffbrückennetzwerk und über eine zweifache Salzbrücke erkannt. In der vorliegenden Arbeit sollten durch ortsgerichtete Mutagenese der konservierten Aminosäurereste des aktiven Zentrums und durch den Einsatz einer misacylierten Gln-tRNA<sup>Glu</sup> die essentiellen Merkmale zur Erkennung der Glutamyl-tRNA durch die GluTR bestimmt werden.

Um die Substraterkennung durch die *E. coli* GluTR experimentell bestimmen zu können, musste zuerst dessen Substrat, Glu-tRNA<sup>Glu</sup>, und ein Analog, Gln-tRNA<sup>Glu</sup>, hergestellt werden. Dazu waren rekombinante und gereinigte GluTR, ihre diversen Varianten, sowie saubere GlnRS und GluRS nötig. Zur Rekonstitution des C<sub>5</sub>-Synthesewegs wurde gereinigte GSA-AM benötigt. Deshalb wurden diese diversen Proteine zunächst rekombinant produziert, wo nötig renaturiert und chromatographisch gereinigt.

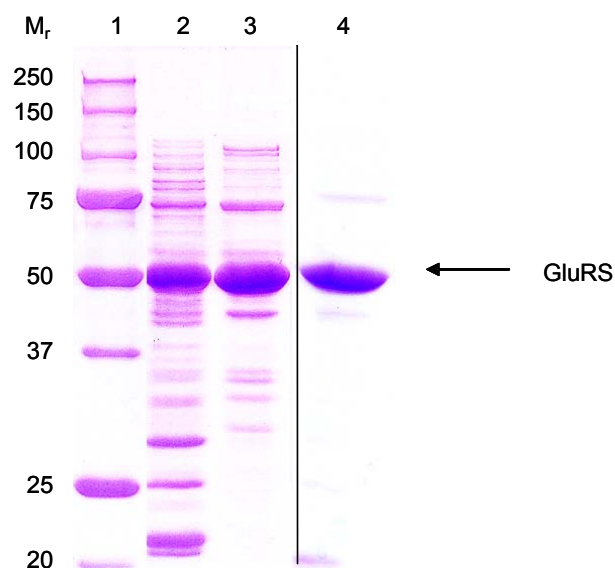
### **3.1.1 Rekombinante Produktion und chromatographische Reinigung der *Escherichia coli* Glutamyl-tRNA Synthetase**

Die Überproduktion der GluRS erfolgte mit Hilfe des Plasmids pLQ7612 mit dem für die *E. coli* GluRS kodierenden *gltX*-Gen (Brisson *et al.*, 1989) im *E. coli* Stamm DH5 $\alpha$ . Bei dem verwendeten Expressionsvektor pLQ7612 handelt es sich um ein thermoinduzierbares „conditional runaway-replication“-System. Bei Temperaturen unterhalb von 37 °C liegt das Plasmid als einfache Kopie in der Zelle vor. Durch Erhöhung der Temperatur auf über 37 °C steigt die Kopienzahl des Vektors auf ca. 1'000 je Zelle an (Larsen *et al.*, 1984). Während der exponentiellen Zunahme der Plasmid-DNA erfolgt gleichzeitig auch die verstärkte Produktion der plasmidkodierten Genprodukte ohne weitere transkriptionelle Induktion. Die Temperaturerhöhung führte zur Bildung einer zusätzlichen Proteinbande im SDS-Gel. Die beobachtete M<sub>r</sub> von etwa

55'000 stimmt mit dem berechneten Molekulargewicht für die *E. coli* GluRS von 53'814 Da überein.

Die Reinigung erfolgte wie bei Lin *et al.* (1992) beschrieben. Nach dem Zellaufschluss mittels Ultraschall und anschließender Zentrifugation befand sich die GluRS mit anderen löslichen Zellbestandteilen im Überstand. Im ersten Reinigungsschritt erfolgte die Verteilung des zellfreien Extrakts in einem Polyethylenglykol/Dextran Zweiphasen-System. Dabei wurde ein großer Teil der Wirtsproteine und der Nukleinsäuren von der GluRS getrennt, die sich mit einigen anderen Proteinen in der oberen Phase befand. Diese verdünnte obere Dextran-Phase wurde nun im zweiten Reinigungsschritt über eine Anionenaustauschchromatographie an MonoQ weiter gereinigt. Die GluRS eluierte spezifisch bei einer Salzkonzentration von 250 mM NaCl.

Da die GluRS nach diesem Reinigungsschritt noch mit einigen anderen Proteinen verunreinigt vorlag (Abbildung 14, Bahn 2 und 3), wurde anschließend eine Gelpermeationschromatographie unter Verwendung von 1 Superdex 200 durchgeführt, um apparent homogenes Enzym zu erhalten (Abbildung 14, Bahn 4).



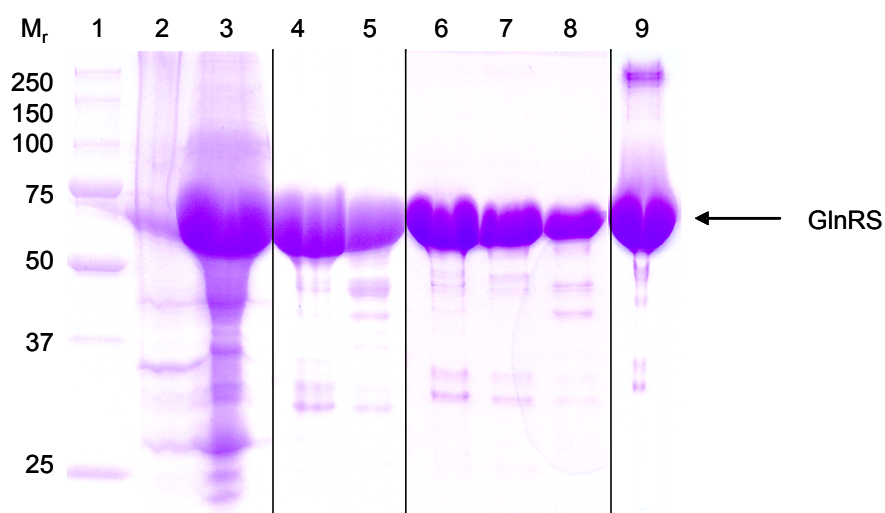
**Abbildung 14: SDS-PAGE der Reinigung rekombinanter *Escherichia coli* Glutamyl-tRNA Synthetase.**

Die Proteine wurden durch ein 12 %iges SDS-Gel getrennt und mittels Coomassie Brilliant Blau-Färbung visualisiert. Alle Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C erhitzt. Bahn 1: 7 µl des Proteinstandards (Precision Plus Protein™ Standard), die relativen molekularen Massen (x 1'000) sind links angegeben. Bahn 2: 10 µl der GluRS enthaltende Fraktion 20 der Anionenaustauschchromatographie. Bahn 3: 10 µl der GluRS enthaltenden Fraktion 21 der Anionenaustauschchromatographie. Bahn 4: 2 µl der GluRS nach Gelpermeationschromatographie an Superdex 200 und Konzentrierung.

Anschließend wurde die GluRS durch Ultrafiltration konzentriert und nach Zusatz von Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 65 % (v/v) bei -20 °C gelagert. Auf diese Weise wurden aus 2.5 g Zellen ca. 17 mg GluRS gewonnen.

### 3.1.2 Rekombinante Produktion und chromatographische Reinigung der *Escherichia coli* Glutaminyl-tRNA Synthetase

Zur enzymatischen Herstellung der misacylierten [ $^{14}\text{C}$ ]Gln-tRNA<sup>Glu</sup> sollte neben der GluRS auch die GlnRS aus *E. coli* verwendet werden. Die Überproduktion der *E. coli* GlnRS erfolgte mit dem Plasmid pET3glnSwt in BL21( $\lambda$ DE3)-Zellen, wobei die Proteinproduktion durch IPTG-Zugabe induziert wurde. Die Ernte der Zellen erfolgte 3 h nach der Induktion. Im SDS-Gel wurde zu diesem Zeitpunkt eine zusätzliche Bande mit einem  $M_r$  von etwa 65'000 beobachtet, die mit dem berechneten Molekulargewicht für die *E. coli* GlnRS von 63'477 Da übereinstimmt.



**Abbildung 15: SDS-PAGE der *Escherichia coli* Glutaminyl-tRNA Synthetase Reinigung.**

Die Proteine wurden durch ein 12 %iges SDS-Gel getrennt und mittels Coomassie Brilliant Blau-Färbung visualisiert. Alle Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C erhitzt. Bahn 1: 7  $\mu\text{l}$  des Proteinstandards (Precision Plus Protein<sup>TM</sup> Standard), die relativen molekularen Massen ( $\times 1'000$ ) sind links angegeben. Bahn 2: Das Zellsediment aus 1 ml BL21( $\lambda$ DE3)/pET3glnSwt-Zellen nach 3 h Induktion mit 400  $\mu\text{M}$  IPTG wurde in 40  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O resuspendiert und mit 40  $\mu\text{l}$  SDS-Probenpuffer versetzt, es wurden 7  $\mu\text{l}$  aufgetragen. Bahn 3: 10  $\mu\text{l}$  des Auftrags auf die erste MonoQ. Bahn 4: 10  $\mu\text{l}$  der GlnRS enthaltenden Fraktion 6 der ersten MonoQ. Bahn 5: 10  $\mu\text{l}$  der GlnRS enthaltenden Fraktion 7 der ersten MonoQ. Bahn 6: 10  $\mu\text{l}$  der GlnRS enthaltenden Fraktion 12 der zweiten MonoQ. Bahn 7: 10  $\mu\text{l}$  der GlnRS enthaltenden Fraktion 13 der zweiten MonoQ. Bahn 8: 10  $\mu\text{l}$  der GlnRS enthaltenden Fraktion 14 der zweiten MonoQ. Bahn 9: 2  $\mu\text{l}$  konzentrierte GlnRS.

Nach dem Zellaufschluss mittels Ultraschall lag das Enzym in löslicher Form im zellfreien Extrakt vor. Der zellfreie Extrakt wurde mittels

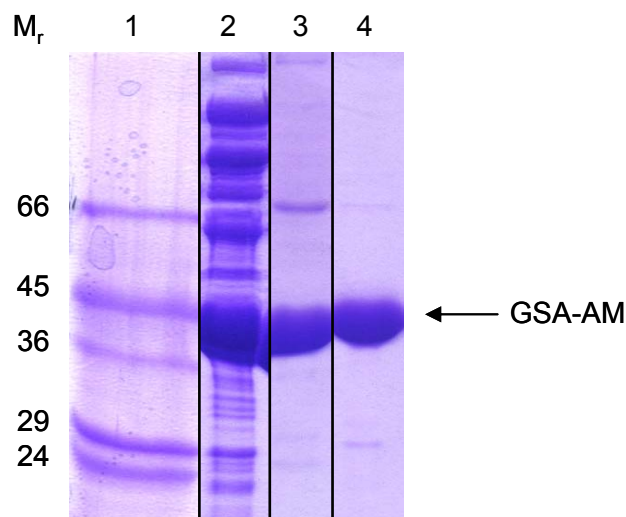


Anionenaustauschchromatographie an MonoQ aufgetrennt. Die GlnRS eluierte hierbei spezifisch bei einer Salzkonzentration von 150 mM NaCl. Da die GlnRS nach diesem Reinigungsschritt noch mit einigen anderen Proteinen verunreinigt vorlag (Abbildung 15, Bahn 4 und 5), wurden die beiden GlnRS enthaltenden Fraktionen vereinigt (~10 ml) und auf das 15-fache Volumen (150 ml) mit Puffer A verdünnt. Diese 150 ml wurden erneut auf die Anionenaustauschchromatographiesäule aufgetragen und die Proteine mit einem flacheren Salzgradienten von 0 - 250 mM NaCl getrennt. Die nun noch enthaltenen Verunreinigungen konnten jedoch für die Substratherstellung vernachlässigt werden. Die GlnRS-enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt (~15 ml) und durch Ultrafiltration bis auf 32 mg/ml konzentriert. Für die langfristige Lagerung bei -20 °C wurde die konzentrierte Proteinlösung dialysiert. Die Ausbeute betrug etwa 12.4 mg Protein aus 1.2 g Zellen.

### **3.1.3 Rekombinante Produktion und Reinigung der *Escherichia coli* Glutamat-1-semialdehyd-2,1-Aminomutase**

Zur Überexpression des *E. coli hemL*-Gens wurde das Plasmid pLIpopC (Ilag *et al.*, 1991) verwendet. In diesem Plasmid steht das *hemL*-Gen unter Kontrolle eines IPTG induzierbaren T7-Promotors. Aus diesem Grund wurde die Expression im *E. coli* Stamm BL21(λDE3) durchgeführt, welcher chromosomal das Gen für die T7-RNA-Polymerase enthält (Studier *et al.*, 1990). Die Zellen wurden 3 h nach der Induktion geerntet, da die rekombinante GSA-AM zu diesem Zeitpunkt bereits den größten Teil der gesamten zellulären Proteine darstellte. Die im SDS-Gel beobachtete  $M_r$  von etwa 45'000 für die rekombinante *E. coli* GSA-AM stimmte mit dem berechneten Molekulargewicht von 45'365 Da überein (Abbildung 16).

Nach dem Zellaufschluss mittels Ultraschall lag das Enzym in löslicher Form im zellfreien Extrakt vor. Da die überproduzierte GSA-AM keinen Affinitätstag besitzt, wurde eine Chromatographie des zellfreien Extrakts an dem Anionenaustauscher DEAE Sepharose<sup>TM</sup> vorgenommen. Hierbei eluierte die GSA-AM bei einer Salzkonzentration von 400 - 600 mM NaCl.



**Abbildung 16: SDS-PAGE der Reinigung rekombinanter *Escherichia coli* Glutamat-1-semialdehyd-2,1-Aminomutase.**

Die Proteine wurden durch ein 12 %iges SDS-Gel getrennt und mittels Coomassie Brilliant Blau-Färbung visualisiert. Alle Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C erhitzt. Bahn 1: 7 µl des Proteinstandards (Sigma Dalton Mark VII-L), die relativen molekularen Massen (x 1'000) sind links angegeben. Bahn 2: 10 µl der GSA-AM enthaltenden Fraktion der Anionenaustauschchromatographie an DEAE Sepharose™. Bahn 3: 10 µl der GSA-AM enthaltenden Fraktion der Anionenaustauschchromatographie an MonoQ. Bahn 4: 2 µl GSA-AM nach Gelpermeationschromatographie an Superdex 75 und Konzentrierung.

Nach diesem ersten Reinigungsschritt lag das Enzym noch mit Wirtsproteinen verunreinigt vor (Abbildung 16, Bahn 2). Deshalb wurde anschließend eine weitere Anionenaustauschchromatographie mit dem starken Anionenaustauscher MonoQ unter Verwendung eines flachen Salzgradienten durchgeführt. Die GSA-AM eluierte dabei spezifisch bei einer NaCl-Konzentration von 500 mM.

Im finalen Reinigungsschritt wurden noch vorhandene Verunreinigungen mittels Gelpermeationschromatographie an Superdex 75 abgetrennt. Hierdurch wurde apparent homogene GSA-AM erhalten. Die GSA-AM enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und durch Ultrafiltration auf bis zu 30 mg/ml konzentriert. Nach dem Zusatz von Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 50 % (v/v) wurde die GSA-AM bei -20 °C gelagert. Die Ausbeute betrug maximal ~50 mg an homogener GSA-AM aus 3 g Zellen.

### 3.1.4 Rekombinante Produktion, Renaturierung und Reinigung der *Escherichia coli* Glutamyl-tRNA Reduktase

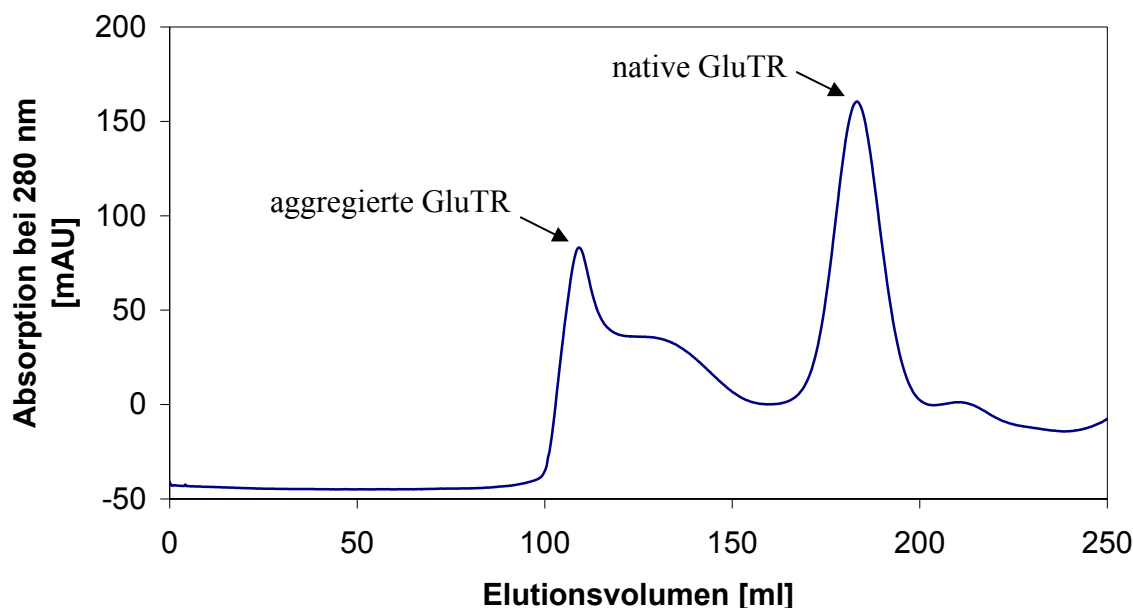
Die Überexpression des *E. coli hemA*-Gens wurde, wie von Dr. Stefan Schauer etabliert (Schauer *et al.*, 2003), unter Verwendung des Expressionsplasmids pBKCwt im *E. coli*

Stamm BL21( $\lambda$ DE3) durchgeführt, der chromosomal das Gen für die T7 RNA-Polymerase enthält. Das produzierte Fusionsprotein besitzt einen N-terminalen His<sub>6</sub>-Tag, der eine affinitätschromatographische Reinigung ermöglicht und durch spezifischen Verdau mit der Protease Thrombin abgespalten werden kann.

Die Überproduktion der GluTR führte zu intrazellulärer Aggregatbildung, so dass nahezu das gesamte rekombinante Protein in Form von unlöslichen Einschlusskörpern („inclusion bodies“) vorlag. Versuche durch Variation der Temperatur vor und nach der Induktion, des Zeitpunkts der Induktion oder der Konzentration des Induktors den Anteil an löslichem Protein zu erhöhen, führten nicht zum gewünschten Ergebnis. Dies bestätigte die Ergebnisse von früheren Arbeiten für die rekombinante Produktion von *E. coli* GluTR (Jahn *et al.*, 1991a; Verkamp *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 1996; Schauer *et al.*, 2003).

Die Abtrennung der „inclusion bodies“ von Zelltrümmern und Membranfragmenten nach dem Zellaufschluss erfolgte durch Waschen des Zellsediments mit einem schwach denaturierenden Puffer in Anwesenheit von Detergenz. Bereits die gereinigten „inclusion bodies“ enthielten nur noch geringe Mengen an Proteinverunreinigungen. Nach dem Solubilisieren der „inclusion bodies“ und der Bindung des Proteins an das mit Ni<sup>2+</sup>-beladene Affinitätsmaterial Chelating Sepharose<sup>TM</sup> (Fast Flow) erfolgte die Faltung der denaturierten GluTR durch einen langsamen Pufferwechsel von denaturierenden zu nativen Bedingungen.

Nach der Rückfaltung wurde die GluTR durch eine Imidazol-Stoßelution von der Säule eluiert. Zur Abtrennung aggregierter Faltungszwischenprodukte, die während der Renaturierung der GluTR entstanden sind, wurde eine Gelpermeationschromatographie an Superdex 200 durchgeführt. Die aggregierte GluTR lässt sich aufgrund ihrer hohen molekularen Masse gut vom nativ gefalteten dimeren Protein mit definierter molekularer Masse trennen. Dabei eluierten die Aggregate bereits bei etwa 105 ml im Ausschlussvolumen der Säule, während die native dimere GluTR bei 175 ml eluierte (Abbildung 17).

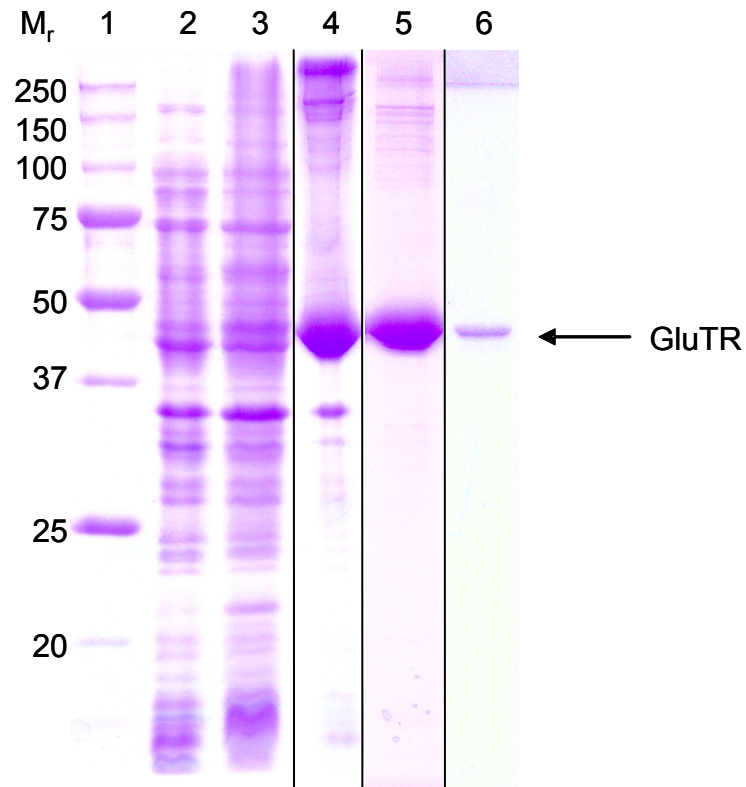


**Abbildung 17: Trennung von nativer und aggregierter *Escherichia coli* Glutamyl-tRNA Reduktase durch Gelpermeationschromatographie an Superdex 200.**

Die rückgefalteten, von der  $\text{Ni}^{2+}$ -beladenen Chelating Sepharose<sup>TM</sup>-Säule eluierten Proteine wurden auf einer Superdex 200 HR 26/60 Säule mit einer Flussrate von 1.6 ml/min mit GPC-Puffer getrennt. Die Detektion erfolgte mittels der FPLC (ÄKTApurifier) bei 280 nm. Die aggregierte GluTR eluierte bei 105 ml, entsprechend dem Ausschlussvolumen der Säule und einer relativen molekularen Masse größer als 600'000. Das native Protein eluierte als symmetrischer Peak bei 175 ml.

Durch diesen letzten Reinigungsschritt wurde apparent homogenes Enzym (> 97 %) gewonnen, wie in Abbildung 18 zu sehen ist.

Die verschiedenen GluTR-Varianten wurden analog produziert und gereinigt. Zur Untersuchung der Bedeutung der V-förmigen dimeren Struktur der GluTR auf die Komplexbildung mit der GSA-AM wurde eine GluTR-Variante konstruiert, bei der vor der Dimerisierungsdomäne ein Stopp-Codon eingefügt wurde. Diese GluTR-Variante A338Stop eluierte bei der abschließenden Gelpermeationschromatographie an Superdex 200 bei einem Volumen von 214 ml. Zur Bestimmung des Oligomerisierungsgrads der GluTRA338Stop wurde anschließend eine analytische Gelfiltration mit einer Superdex 75 HR 10/30 Säule durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die GluTRA338Stop bei einem relativen Molekulargewicht von etwa 45'000 eluierte. Bei einem berechneten  $M_r$  der GluTRA338Stop von 40'112 Da kann daraus gefolgert werden, dass die GluTRA338Stop nicht mehr in der Lage ist ein Dimer zu bilden und somit als Monomer vorliegt. Mit Hilfe der CD-Spektroskopie wurde zusätzlich die korrekte Faltung der untersuchten GluTR-Varianten bestätigt.



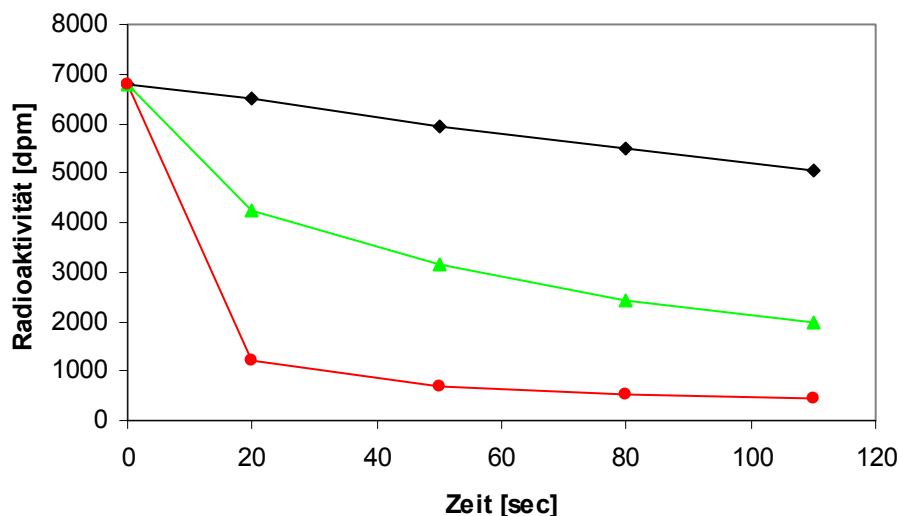
**Abbildung 18: SDS-Page der Reinigung rekombinanter *Escherichia coli* Glutamyl-tRNA Reduktase.**

Die Proteine wurden durch ein 12 %iges SDS-Gel getrennt und mittels Coomassie Brilliant Blau-Färbung visualisiert. Alle Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C erhitzt. Bahn 1: 7  $\mu$ l des Proteinstandards (Precision Plus Protein<sup>TM</sup> Standard), die relativen molekularen Massen ( $\times 1'000$ ) sind links angegeben. Bahn 2 und 3: Das Zellsediment aus 1 ml BL21( $\lambda$ DE3)/pBKCwt-Zellen vor Induktion (Bahn 2) und nach 2 h Induktion durch 250  $\mu$ M IPTG (Bahn 3) wurde in 40  $\mu$ l H<sub>2</sub>O resuspendiert und mit 40  $\mu$ l SDS-Probenpuffer versetzt. Es wurden je 7  $\mu$ l aufgetragen. Bahn 4: gereinigte „inclusion bodies“. Bahn 5: 10  $\mu$ l der GluTR enthaltenden Fraktionen nach der Rückfaltung auf der Ni<sup>2+</sup>-beladenen Chelating Sepharose<sup>TM</sup>. Bahn 6: 5  $\mu$ l der homogenen, konzentrierten GluTR nach der Gelfiltrationschromatographie.

### 3.1.5 Glutamyl-tRNA Reduktase Aktivitätstest (Depletionstest)

Zur Bestimmung der GluTR Aktivität wurde der in unserer Arbeitsgruppe etablierte Aktivitätstest verwendet (Lorenz, 1998), der die Abnahme des Substrats Glu-tRNA<sup>Glu</sup> verfolgt. Dieser basiert auf dem klassischen Test für die Bestimmung der Aktivitäten von Aminoacyl-tRNA Synthetasen. Die Aktivität dieser Enzyme wird bestimmt, indem das [<sup>14</sup>C]-markierte Reaktionsprodukt, die aminoacylierte tRNA, durch Säure-Präzipitation und anschließende Szintillationszählung quantifiziert wird (Hoben & Söll, 1985). Im Aktivitätstest für die GluTR wird nun nicht die Produktbildung detektiert,

sondern die Substratabnahme, da nur die Radioaktivität des [ $^{14}\text{C}$ ]Glu-tRNA<sup>Glu</sup>-Substrats präzipitiert werden kann.



**Abbildung 19: Aktivitätsbestimmung rekombinanter *Escherichia coli* Glutamyl-tRNA Reduktase mittels Depletionstest.**

Ein 80  $\mu\text{l}$  Reaktionsansatz enthielt ca. 2  $\mu\text{M}$  [ $^{14}\text{C}$ ]Glu-tRNA<sup>Glu</sup>, 25 - 150 nM rekombinante, gereinigte GluTR, 0.3 mg/ml BSA und 2 mM NADPH und wurde bei 37 °C inkubiert. Ein Aliquot von 15  $\mu\text{l}$  des 80  $\mu\text{l}$  Reaktionsansatzes wurde zu den angegebenen Zeitpunkten auf einen Filter aufgebracht und mit 10 % TCA gefällt. Nach intensivem Waschen der Filter wurde diese in je 4 ml Szintillationsflüssigkeit (OptiPhase HiSafe 2) überführt und die verbleibende Radioaktivität durch Szintillationszählung im Tri-carb 2900 TR quantifiziert (in dpm).

◆: Reaktionsansatz ohne Enzymzusatz zeigt die spontane Hydrolyse des Substrats

▲: Substratabnahme bei 25 nM GluTR

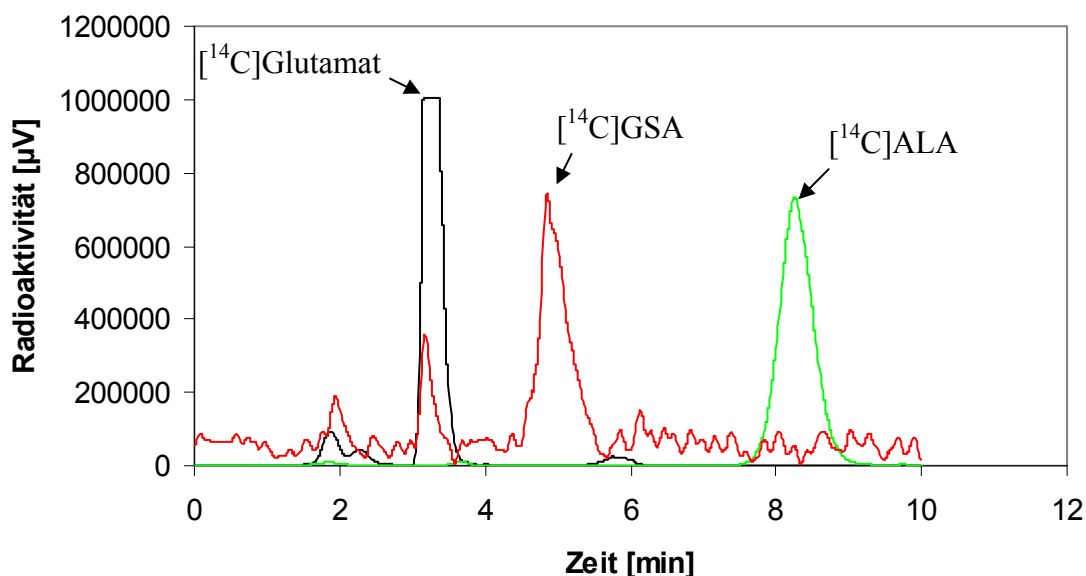
●: Substratabnahme bei 150 nM GluTR

In Abbildung 19 ist exemplarisch der Standard-Depletionstest für die *E. coli* GluTR dargestellt. Die spontane Substrathydrolyse wurde als Hintergrund bei der Berechnung von Enzymaktivitäten berücksichtigt.

### 3.1.6 Darstellung der Reaktionsprodukte des C<sub>5</sub>-Synthesewegs mittels HPLC

Das Reaktionsprodukt der GluTR, [ $^{14}\text{C}$ ]GSA, kann mit diesem Depletionstest nicht detektiert werden. Es ist daher notwendig weitere Analysen durchzuführen, da die Abnahme des Substrats auch auf der Esterase-Aktivität der GluTR, der einfachen Hydrolyse der Esterbindung zwischen Glutamat und der tRNA, beruhen kann (Moser *et al.*, 1999). Die Produktbildung wurde aus diesem Grund durch HPLC-Analysen eindeutig nachgewiesen, um die Reduktase-Aktivität der GluTR von der Esterase-Aktivität unterscheiden zu können. Zusätzlich kann durch Zugabe der GSA-AM [ $^{14}\text{C}$ ]GSA in [ $^{14}\text{C}$ ]ALA umgewandelt werden, welches ebenfalls durch die HPLC-

Analysen identifiziert werden kann (Abbildung 20). Mit Hilfe dieses Testsystems wurden sowohl verschiedene GluTR-Varianten als auch eine Variante des natürlichen Substrats Glu-tRNA<sup>Glu</sup> analysiert.



**Abbildung 20: Trennung und Nachweis von  $[^{14}\text{C}]$ Glutamat,  $[^{14}\text{C}]$ Glutamat-1-semialdehyd und  $[^{14}\text{C}]$ 5-Aminolävulinsäure mittels HPLC.**

Gezeigt sind Eichläufe mit je 1  $\mu\text{l}$   $[^{14}\text{C}]$ Glutamat (273.3 mCi/mmol) und  $[^{14}\text{C}]$ ALA (47.6 mCi/mmol). Der Ansatz zur Produktion von  $[^{14}\text{C}]$ GSA bestand aus 2  $\mu\text{M}$   $[^{14}\text{C}]$ Glu-tRNA<sup>Glu</sup>, die unter Standardbedingungen mit 1  $\mu\text{M}$  GluTR für 15 min inkubiert wurde. Die gereinigten Ansätze wurden mit einer Flussrate von 1 ml/min auf eine Waters Bondapak<sup>TM</sup> C<sub>18</sub>-Säule (3.9 x 150 mm, 125 Å Porengröße, 10  $\mu\text{m}$  Partikeldurchmesser) mit HPLC-Puffer als Laufmittel geladen. Die Analyse wurde mittels eines Durchfluss-Szintillationszählers durchgeführt. Die chromatographisch getrennten Ansätze enthielten folgende Komponenten:

Schwarz:  $[^{14}\text{C}]$ Glutamat; Rot:  $[^{14}\text{C}]$ Glu-tRNA<sup>Glu</sup> und GluTR; Grün:  $[^{14}\text{C}]$ ALA

### 3.1.7 Herstellung der misacylierten $[^{14}\text{C}]$ Gln-tRNA<sup>Glu</sup>

Zur Untersuchung der Substraterkennung durch die GluTR sollte eine misacylierte Gln-tRNA<sup>Glu</sup> verwendet werden. Um die enzymatische Misacylierung zu optimieren, wurden sowohl die GluRS als auch die GlnRS eingesetzt. Des Weiteren wurden die Konzentration der Enzyme, der tRNA und des  $[^{14}\text{C}]$ Glutamins variiert. Dabei wurde festgestellt, dass sich die Acylierungsrate durch eine Steigerung der Enzymkonzentration auf 15  $\mu\text{M}$  bei gleichzeitiger Erniedrigung der tRNA-Konzentration auf 2  $\mu\text{M}$  steigern lässt. Die Beladungsrate durch die GluRS ist bei geringeren tRNA<sup>Glu</sup>-Konzentrationen im Gegensatz zur Beladungsrate der GlnRS

wesentlich höher (Tabelle 1). Das [ $^{14}\text{C}$ ]Glutamin sollte dabei immer im 2 - 20 fachen molarem Überschuss zur  $\text{tRNA}^{\text{Glu}}$  vorhanden sein. Nach einer Inkubationszeit von 1 h wurde jeweils die maximale Beladungsrate erzielt.

**Tabelle 1:** Beladung der *Escherichia coli*  $\text{tRNA}^{\text{Glu}}$  mit [ $^{14}\text{C}$ ]Glutamin durch die *Escherichia coli* Glutamyl-tRNA Synthetase bzw. die Glutaminyl-tRNA Synthetase bei unterschiedlichen tRNA-Konzentrationen.

Die 25  $\mu\text{l}$  Ansätze enthielten 4 mM ATP, ca. 12.5  $\mu\text{M}$  Enzym, 20  $\mu\text{M}$  [ $^{14}\text{C}$ ]Glutamin und verschiedene  $\text{tRNA}^{\text{Glu}}$ -Konzentrationen in GluRS-Acylierungspuffer. Die Ansätze wurden 1 h bei 37 °C inkubiert, zum Abstoppen vollständig auf einen Filter pipettiert und die beladene tRNA in 10 % TCA gefällt. Nach intensivem Waschen der Filter wurden diese in je 4 ml Szintillationsflüssigkeit (OptiPhase HiSafe 2) überführt und die verbleibende Radioaktivität durch Szintillationszählung im Tri-carb 2900 TR quantifiziert. Die gezeigten Ergebnisse entsprechen den Anteilen an beladener tRNA von der jeweils eingesetzten tRNA Menge in %.

| $\text{tRNA}^{\text{Glu}}$ | GluRS | GlnRS |
|----------------------------|-------|-------|
| 10 $\mu\text{M}$           | 9 %   | 8.4 % |
| 2 $\mu\text{M}$            | 57 %  | 5 %   |
| 1 $\mu\text{M}$            | 42 %  | 4 %   |

In der Zelle konkurrieren die tRNA-Synthetasen um die unbeladenen tRNAs, die dort nur in geringer Zahl vorhanden sind. Daher reagieren die tRNA-Synthetasen bei geringen tRNA-Konzentrationen (1 - 2  $\mu\text{M}$ ) sehr spezifisch nur mit der entsprechenden tRNA. Dies wird auch durch die gezeigten Ergebnisse bestätigt, da die GluRS die  $\text{tRNA}^{\text{Glu}}$  unter den gewählten Bedingungen mit der größten Effizienz belädt. Aus den gewonnen Ergebnissen kann auch abgeleitet werden, dass bei hohen Aminosäurekonzentrationen *in vitro* die tRNA-Synthetasen eine höhere Misacylierungsrate aufweisen als unter natürlichen Bedingungen.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für die Herstellung der misacylierten [ $^{14}\text{C}$ ]Gln- $\text{tRNA}^{\text{Glu}}$  die GluRS verwendet. Der optimale Misacylierungsansatz beinhaltet folgende Komponenten in einem Volumen von 1 ml: 2  $\mu\text{M}$  *E. coli*  $\text{tRNA}^{\text{Glu}}$ , 4 mM ATP, 15  $\mu\text{M}$  GluRS und 25  $\mu\text{M}$  [ $^{14}\text{C}$ ]Glutamin in GluRS-Assay-Puffer.



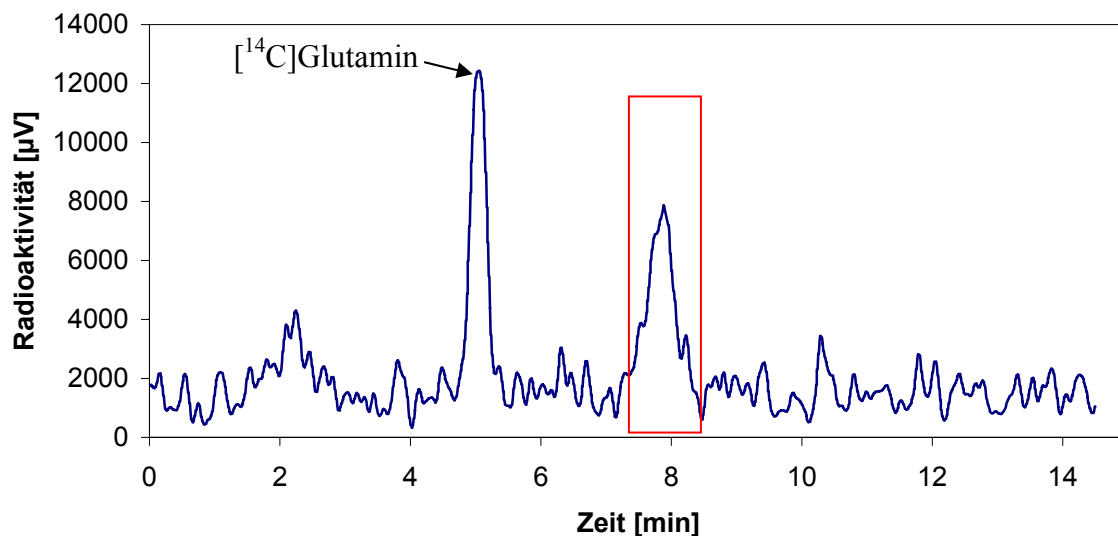
### 3.1.8 Misacylierte Gln-tRNA<sup>Glu</sup> ist ein Substrat für die *Escherichia coli* Glutamyl-tRNA Reduktase

Eine wesentliche Wechselwirkung zwischen dem Glutamat-Teil des Substrats und der GluTR stellt vermutlich die zweifache Salzbrücke der Carboxylatgruppe des Substrats (O $\epsilon_1$  und O $\epsilon_2$ ) mit der positiv geladenen Guanidin Gruppe von Arginin 52 (Atome N $\epsilon$  und N $\eta_1$ ) dar (Abbildung 13). Es wurde postuliert, dass diese Salzbrücke eine wichtige Funktion bei der Diskriminierung zwischen unterschiedlichen tRNA-Substraten (Glu-tRNA<sup>Glu</sup> versus Gln-tRNA<sup>Glu</sup>) besitzt (Moser *et al.*, 2001).

Zur näheren Charakterisierung der Funktion dieser Salzbrücke sollte eine mit Glutamin misacylierte tRNA<sup>Glu</sup> verwendet werden ([<sup>14</sup>C]Gln-tRNA<sup>Glu</sup>). Dabei wurde erwartet, dass diese misacylierte [<sup>14</sup>C]Gln-tRNA<sup>Glu</sup> aufgrund der nicht vorhandenen Carboxylatgruppe kein Substrat für die rekombinant gereinigte *E. coli* GluTR darstellt.

Um diese Hypothese zu prüfen, wurde die [<sup>14</sup>C]Gln-tRNA<sup>Glu</sup> im Depletionstest (siehe Material und Methoden) für die GluTR als Substrat eingesetzt. Dabei zeigte sich jedoch, dass [<sup>14</sup>C]Gln-tRNA<sup>Glu</sup> effizient als Substrat für die rekombinant gereinigte *E. coli* GluTR *in vitro* fungiert. Es wurde eine spezifische Aktivität beobachtet, die etwa 15 % der Aktivität für das natürliche Substrat entsprach.

In der anschließenden HPLC-Analyse der Reaktionsprodukte konnte gezeigt werden, dass durch den Umsatz der [<sup>14</sup>C]Gln-tRNA<sup>Glu</sup> durch die GluTR eine radioaktiv markierte Substanz entsteht, die weder das Laufverhalten von Glutamat (5 min) noch von Glutamin (5 min) besitzt (Abbildung 21). Die erhaltene Substanz eluierte nach ca. 8 min in der Nähe von GSA (7.9 min). Aufgrund der geringen Menge dieser neu gebildeten [<sup>14</sup>C]-markierten Substanz (< 1 pmol) waren alle Versuche zur Bestimmung der genauen chemischen Natur dieser Substanz durch NMR oder Massenspektrometrie erfolglos.



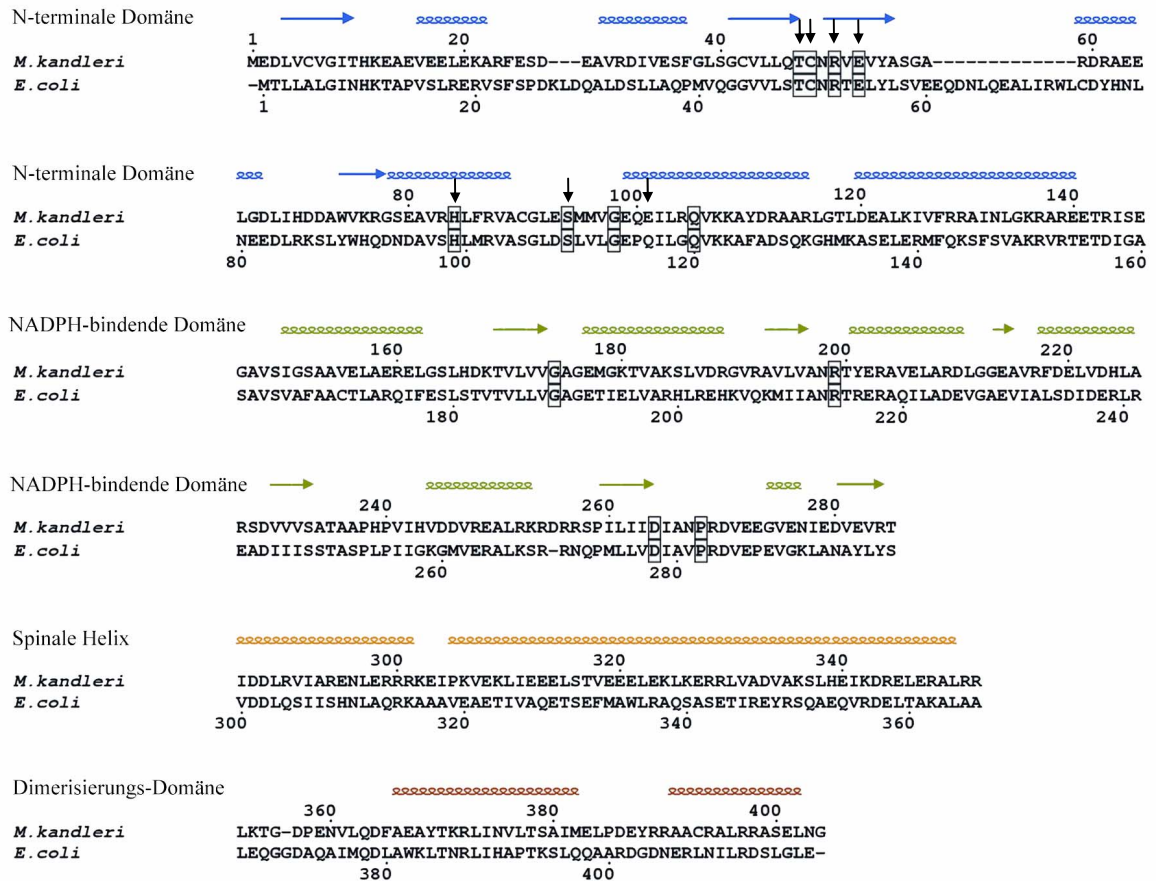
**Abbildung 21: HPLC-Analyse der Glutamyl-tRNA Reduktase-Reaktion mit der misacylierten  $[^{14}\text{C}]\text{Gln-tRNA}^{\text{Glu}}$ .**

Gezeigt ist der Umsatz von 100 nM  $[^{14}\text{C}]\text{Gln-tRNA}^{\text{Glu}}$  durch 500 nM GluTR in einem Volumen von 20 µl in GluTR-Assay-Puffer mit 0.3 mg/ml BSA und 2 mM NADPH. Der Ansatz wurde 15 min bei 37 °C inkubiert. Der gereinigte Ansatz wurde mit einer Flussrate von 0.75 ml/min auf eine Waters Bondapak<sup>TM</sup> C<sub>18</sub>-Säule (3.9 x 150 mm, 125 Å Porengröße, 10 µm Partikeldurchmesser) mit HPLC-Puffer als Laufmittel geladen. Die Analyse wurde mittels eines Durchfluss-Szintillationszählers durchgeführt. Die durch Umsatz der  $[^{14}\text{C}]\text{Gln-tRNA}^{\text{Glu}}$  durch die GluTR entstandene radioaktive Substanz ist durch einen roten Rahmen markiert.

Die Tatsache, dass  $[^{14}\text{C}]\text{Gln-tRNA}^{\text{Glu}}$  von der GluTR als Substrat akzeptiert wird, deutet darauf hin, dass die Erkennung des Glutamats durch Arginin 52 und dem umgebenden Wasserstoffbrückennetzwerk nicht essentiell für die GluTR-Erkennung ist. Die zweifache Salzbrücke stellt somit zwar eine wichtige Interaktion zwischen Substrat und Enzym dar, dient aber nicht zur Diskriminierung zwischen Glutamat und Glutamin in der Substratbindungstasche.

### 3.1.9 Aktivitätstest der Glutamyl-tRNA Reduktase-Mutanten des aktiven Zentrums

Insgesamt sind 13 Aminosäuren in allen bisher bekannten GluTR Proteinen hoch konserviert. Neun davon sind in der katalytischen Domäne lokalisiert (Abbildung 22). Aus der Kristallstruktur der GluTR aus *M. kandleri* lässt sich erkennen, dass das hoch geordnete Netzwerk zur Erkennung des Glutamycins von diesen konservierten Aminosäuren ausgebildet wird.



**Abbildung 22: Strukturbasierendes Sequenzalignment der Glutamyl-tRNA Reduktase aus *Methanopyrus kandleri* und *Escherichia coli*.**

Die hoch konservierten Aminosäuren der GluTRs sind umrandet, die farbigen Pfeile markieren  $\beta$ -Faltblätter und die Spiralen markieren  $\alpha$ -Helices. Die in dieser Arbeit veränderten Aminosäuren sind durch schwarze Pfeile markiert.

Bisher gibt es jedoch, mit Ausnahme des katalytisch wichtigen Cysteins, noch keine Analyse der Funktion dieser einzelnen Aminosäuren. Um die Funktion der einzelnen Aminosäurereste während der Substraterkennung näher zu charakterisieren, wurden verschiedene GluTR-Varianten erzeugt, bei denen durch ortsgerichtete Mutagenese jeweils ein Aminosäurerest verändert wurde. Die verschiedenen GluTR-Varianten wurden analog zum Wildtyp-Enzym produziert, gereinigt und im Depletionstest mit anschließender HPLC-Analyse zur Aktivitätsbestimmung eingesetzt.

In Tabelle 2 sind die Ergebnisse der durchgeführten Aktivitätsuntersuchungen zusammengefasst.

**Tabelle 2: Reduktase- und Esterase-Aktivitäten der verschiedenen Glutamyl-tRNA Reduktase-Varianten.**

Die Aktivitäten der verschiedenen GluTR-Varianten wurden mit Hilfe der volumenreduzierten Reaktionsansätze (15 µl) bestimmt. Je nach Aktivität der Mutante enthielten die Ansätze 5.7 nM - 1 µM GluTR, 25 µg BSA und 2 mM NADPH. Die Ansätze wurden bei 37 °C inkubiert, 10 sec nach Reaktionsstart durch Zugabe von 100 nM [<sup>14</sup>C]Glu-tRNA<sup>Glu</sup> wurde der gesamte Ansatz zum Abstoppen auf einen Filter aufgebracht und mit 10 % TCA gefällt. Nach intensivem Waschen der Filter wurden diese in je 4 ml Szintillationsflüssigkeit (OptiPhase HiSafe 2) überführt und die verbleibende Radioaktivität durch Szintillationszählung im Tri-carb 2900 TR quantifiziert. Je GluTR-Variante wurden vier Enzymkonzentrationen in dreifacher Wiederholung analysiert. Die Aktivität wurde als Verhältnis der Geschwindigkeit zur Enzymkonzentration bestimmt. Die Aktivität der GluTR-Varianten wurde in Relation zu der des Wildtyp-Enzyms (100 %) gesetzt. n.m.: nicht messbar.

| Enzym | Aktivität mit [ <sup>14</sup> C]Glu-tRNA <sup>Glu</sup> [%] |                      |
|-------|-------------------------------------------------------------|----------------------|
|       | Reduktase<br>(+NADPH)                                       | Esterase<br>(-NADPH) |
| wt    | 100                                                         | 100                  |
| S109A | 28                                                          | 25                   |
| T49V  | 10                                                          | 5                    |
| H99N  | 5                                                           | 4                    |
| E54K  | 6                                                           | 2                    |
| R52K  | 5                                                           | 4                    |
| R52Q  | n.m.                                                        | n.m.                 |

### 3.1.10 Strukturelle Flexibilität der Glutamat-Erkennungstasche

Mit Hilfe der GluTR-Varianten R52Q und R52K sollte die Funktion von Arginin 52 während der Substraterkennung untersucht werden. Dabei wurde beobachtet, dass die GluTR-Variante R52Q keine messbare Aktivität mehr besitzt, die GluTR-Variante R52K jedoch noch 5 % Reduktase-Aktivität *in vitro* aufweist (Tabelle 2). Durch die Umsetzung der misacylierten [<sup>14</sup>C]Gln-tRNA<sup>Glu</sup> konnte bereits gezeigt werden, dass die postulierte Salzbrücke zwischen Arginin 52 und der Carboxylatgruppe des Substrats nicht zwingend für die Substraterkennung benötigt wird, da das ungeladene Glutamin der Gln-tRNA<sup>Glu</sup> als Substrat akzeptiert wird. Die positive Ladung des Arginins scheint stattdessen für die Wechselwirkung mit den direkt benachbarten Aminosäureresten Glutamat 54 und Histidin 99 und der umgebenden Seitenketten benötigt zu werden. Da sich die positive Ladung des Lysins (Nζ) in der R52K-Variante vermutlich zwischen der

des Arginin N $\epsilon$  und N $\eta$  befindet, ist sowohl die Koordinierung des Glutamats 54 als auch prinzipiell die Koordinierung des Substrats möglich.

Die Beteiligung von Arginin 52 an der Stabilisierung der Glutamat-Erkennungstasche wurde untersucht, indem die direkt benachbarten Aminosäurereste Histidin 99 und Glutamat 54 durch Asparagin bzw. Lysin ersetzt wurden. Die GluTR-Varianten H99N und E54K besitzen jedoch noch signifikante Reduktase-Aktivität (Tabelle 2), was die Ergebnisse früherer Analysen für die entsprechende Mutante H84N aus *M. kandleri* bestätigt. Auch die *M. kandleri* GluTR-Variante H84N besitzt nur eine teilweise reduzierte Enzymaktivität (Moser *et al.*, 1999).

Neben dem N $\eta$  von Arginin 52 koordinieren auch die Seitenketten von Serin 109 und Threonin 49 das Carboxylat-O $\epsilon_1$  des Glutamat-Teils des Substrats. Die GluTR-Varianten S109A und T49V besitzen zwar eine verringerte GluTR Aktivität, aber der Austausch der Aminosäuren an diesen beiden Positionen führt nicht zum vollständigen Verlust der GluTR-Aktivität (Tabelle 2).

Diese Ergebnisse führen zu der Schlussfolgerung, dass die Region um Arginin 52 bis zu einem gewissen Grad verändert werden kann, ohne dass die Enzymaktivität vollständig verloren geht. Es wurde vermutet, dass diese Flexibilität möglicherweise eine Voraussetzung für das vorgeschlagene „metabolic channeling“ ist. Hierbei wird das Produkt der GluTR-Reaktion, GSA, direkt vom aktiven Zentrum der GluTR zum aktiven Zentrum der GSA-AM weitergeleitet. Aus der Struktur der GluTR aus *M. kandleri* lässt sich erkennen, dass der postulierte Weg des GSA teilweise durch das Arginin 52 blockiert wird. Für eine effiziente Weiterleitung des GSA muss das Arginin 52 seine Position deutlich verändern. Diese postulierte Konformationsänderung erfordert möglicherweise die strukturelle Umorientierung der Substratbindungstasche im Bereich des Arginin 52.

### **3.1.11 Versuche zur Veränderung der Substratspezifität der Glutamyl-tRNA Reduktase**

Durch den Austausch von Arginin 52 zu Glutamin sollte möglicherweise eine Veränderung der Substratspezifität von tRNA-gebundenem Glutamat hin zu Glutamin erzielt werden. Das in der GluTR-Variante R52Q eingefügte Glutamin sollte aufgrund der Ladungsverhältnisse besser mit der Gln-tRNA<sup>Glu</sup> als mit der Glu-tRNA<sup>Glu</sup> in Wechselwirkung treten können. Dadurch sollte die Aktivität der R52Q Variante unter

Verwendung der misacylierten [ $^{14}\text{C}$ ]Gln-tRNA<sup>Glu</sup> größer sein als mit der [ $^{14}\text{C}$ ]Glu-tRNA<sup>Glu</sup>. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die R52Q Variante sowohl mit [ $^{14}\text{C}$ ]Glu-tRNA<sup>Glu</sup> als auch mit der misacylierten [ $^{14}\text{C}$ ]Gln-tRNA<sup>Glu</sup> keine messbare Aktivität besitzt (Tabelle 2 und 3). Des Weiteren wurden auch die Aktivitäten der anderen GluTR-Varianten, die die Koordinierung der Carboxylatgruppe des Glutamats betreffen (R52K, S109A, T49V), mit der [ $^{14}\text{C}$ ]Gln-tRNA<sup>Glu</sup> bestimmt. Doch zeigte keine der getesteten GluTR-Varianten eine messbare Aktivität (Tabelle 3). Eine Veränderung der Substratspezifität von [ $^{14}\text{C}$ ]Glu-tRNA<sup>Glu</sup> zu [ $^{14}\text{C}$ ]Gln-tRNA<sup>Glu</sup> konnte demnach durch den Austausch einer einzelnen Aminosäure nicht erreicht werden.

**Tabelle 3: Aktivitäten der verschiedenen Glutamyl-tRNA Reduktase-Varianten mit dem Substrat [ $^{14}\text{C}$ ]Gln-tRNA<sup>Glu</sup>.**

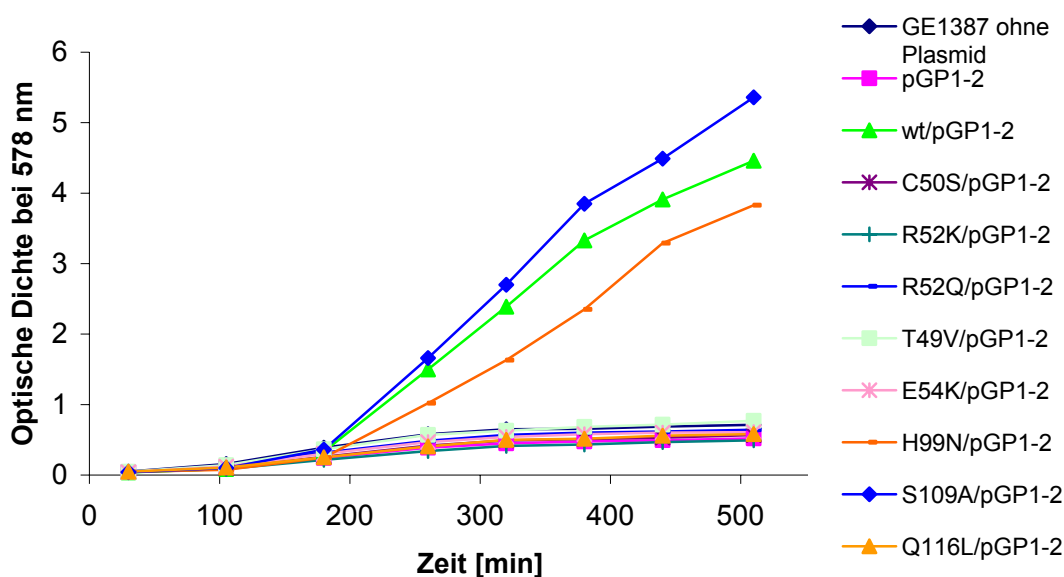
Die Aktivitäten der verschiedenen GluTR-Varianten wurden mit Hilfe der volumenreduzierten Reaktionsansätze (15  $\mu\text{l}$ ) bestimmt. Je nach Aktivität der Mutante enthielten die Ansätze 5.7 nM - 1  $\mu\text{M}$  GluTR, 25  $\mu\text{g}$  BSA und 2 mM NADPH. Die Ansätze wurden bei 37 °C inkubiert, 10 sec nach Reaktionsstart durch Zugabe von 100 nM [ $^{14}\text{C}$ ]Gln-tRNA<sup>Glu</sup> wurde der gesamte Ansatz zum Abstoppen auf einen Filter aufgebracht und mit 10 % TCA gefällt. Nach intensivem Waschen der Filter wurden diese in je 4 ml Szintillationsflüssigkeit (OptiPhase HiSafe 2) überführt und die verbleibende Radioaktivität durch Szintillationszählung im Tri-carb 2900 TR quantifiziert. Je GluTR-Variante wurden vier Enzymkonzentrationen in dreifacher Wiederholung analysiert. Die Aktivität wurde als Verhältnis der Geschwindigkeit zur Enzymkonzentration bestimmt. Die Aktivität der GluTR-Varianten wurde in Relation zu der des Wildtyp-Enzyms mit [ $^{14}\text{C}$ ]Glu-tRNA<sup>Glu</sup> (100 %) gesetzt. n.m.: nicht messbar.

| Enzym | Aktivität mit [ $^{14}\text{C}$ ]Gln-tRNA <sup>Glu</sup> [%] |
|-------|--------------------------------------------------------------|
| wt    | 15                                                           |
| S109A | n.m.                                                         |
| T49V  | n.m.                                                         |
| R52K  | n.m.                                                         |
| R52Q  | n.m.                                                         |

### 3.1.12 Komplementation des *Escherichia coli hemA*<sup>-</sup> Stamms GE1387 durch verschiedene *hemA* Mutanten, die Aminosäureaustausche im aktiven Zentrum der Glutamyl-tRNA Reduktase kodieren

Die gewonnenen Daten der *in vitro* Aktivitätsuntersuchungen für die verschiedenen GluTR-Varianten sollten durch *in vivo* Analysen untermauert werden. Zu diesem Zweck wurden alle GluTR-Varianten bezüglich ihrer Fähigkeit untersucht, die Tetrapyrrolbiosynthese *in vivo* aufrecht zu erhalten. Der ALA-auxotrophe *E. coli*

Stamm GE1387 repräsentiert ein für diesen Zweck geeignetes Testsystem. Durch eine Mutation im *hemA*-Gen ist dieser Stamm nicht mehr in der Lage das für alle Tetrapyrrole benötigte Vorläufermolekül ALA zu bilden (Verkamp *et al.*, 1993). Zur Komplementation der *hemA*-Defizienz wurden GE1387-Zellen mit den Plasmiden, die für die Wildtyp-GluTR und die verschiedenen Mutanten kodieren zusammen mit dem hitzeinduzierbaren, für die T7 RNA Polymerase kodierenden Plasmid pGP1-2 transformiert. Die resultierenden Wachstumskurven zeigen, dass neben der Wildtyp-GluTR nur die beiden GluTR-Varianten S109A und H99N in der Lage sind, die GluTR-Aktivität in den GE1387-Zellen zu komplementieren (Abbildung 23).



**Abbildung 23: Wachstumskurven der mit den für die verschiedenen Glutamy-tRNA Reduktase-Varianten kodierenden *hemA*-Genen transformierten GE1387-Zellen (*hemA*<sup>-</sup>).**

Die die verschiedenen GluTR kodierenden Plasmide und das Plasmid für die T7 RNA Polymerase enthaltenden GE1387-Zellen wurden in LB-Medium ohne ALA-Zusatz mit 100 µg/ml Ampicillin und 10 µg/ml Kanamycin bei 37 °C inkubiert. Zur Bestimmung des Wachstums wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen und die optische Dichte bei 578 nm bestimmt.

Obwohl die GluTR-Variante T49V *in vitro* eine höhere Aktivität als die H99N-Variante aufweist (Tabelle 1), ist sie nicht in der Lage genügend ALA für die Aufrechterhaltung der Tetrapyrrolbiosynthese herzustellen. Die GluTR-Varianten E54K und R52K zeigen eine ähnliche Aktivität wie die H99N-Variante, doch im Gegensatz zur H99N-Variante konnte bei den mit den für E54K und R52Q kodierenden Plasmiden transformierten GE1387-Zellen kein Wachstum ohne zusätzliche ALA-Zugabe beobachtet werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die gewonnenen *in vitro* Daten nicht vollständig auf die tatsächliche *in vivo* Aktivität übertragbar sind. In der *E. coli* Zelle wird die GluTR-

Aktivität vermutlich noch von anderen Faktoren beeinflusst, die während des *in vitro* Aktivitätstest nicht analysiert werden.

### **3.2 Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus der *Escherichia coli* Glutamyl-tRNA Reduktase**

Während der von der GluTR katalysierten Reaktion wird ein Enzym-gebundenes Thioester-Zwischenprodukt gebildet. Das konservierte Cystein 50 des aktiven Zentrums greift in einer nukleophilen Reaktion den aktivierten  $\alpha$ -Carbonyl-Kohlenstoff der Glutamyl-tRNA an, wodurch das kovalente Thioester-Zwischenprodukt entsteht. Dieser Reaktionsmechanismus wurde durch verschiedene biochemische Studien sowohl für die *E. coli* GluTR als auch für die *M. kandleri* GluTR verifiziert und konnte anhand der gelösten Kristallstruktur der *M. kandleri* GluTR bestätigt werden. Im Gegensatz zu dieser gut untersuchten Thioesterbildung zwischen Substrat und Enzym während der GluTR Katalyse wurde die Reduktion des Enzym-gebundenen Glutamats zu GSA noch nicht im Detail analysiert. Das für die Reduktion benötigte Hydrid-Ion wird von NADPH zur Verfügung gestellt. In der Kristallstruktur der GluTR aus *M. kandleri* befindet sich die NADPH-Bindestelle in der NADPH-Domäne jedoch 21 Å vom aktiven Zentrum entfernt. Es wurde daher postuliert, dass sich die NADPH-Domäne in Richtung des aktiven Zentrums bewegt. Möglicherweise wird diese Bewegung durch die Glu-tRNA<sup>Glu</sup>-Bindung initiiert, wodurch NADPH in der Nähe des Substrats positioniert wird. Da das in der Kristallstruktur vorhandene Glutaminsäure keinen entsprechenden tRNA-Teil besitzt, befindet sich vermutlich die GluTR in der Kristallstruktur in einer „offenen“ Konformation. In der vorliegenden Arbeit sollten neue Erkenntnisse bezüglich der bisher noch nicht genau analysierten Reduktion des Enzym-gebundenen Glutamats und der postulierten Bewegung der NADPH-Domäne gewonnen werden.

#### **3.2.1 Die Funktion von Glutamin 116 während des Hydridtransfers von NADPH**

Bei den Untersuchungen der verschiedenen GluTR-Varianten des aktiven Zentrums wurde eine GluTR-Variante identifiziert, Q116L, die keine Reduktase-Aktivität mehr, jedoch noch 30 % der Wildtyp Esterase-Aktivität besitzt.



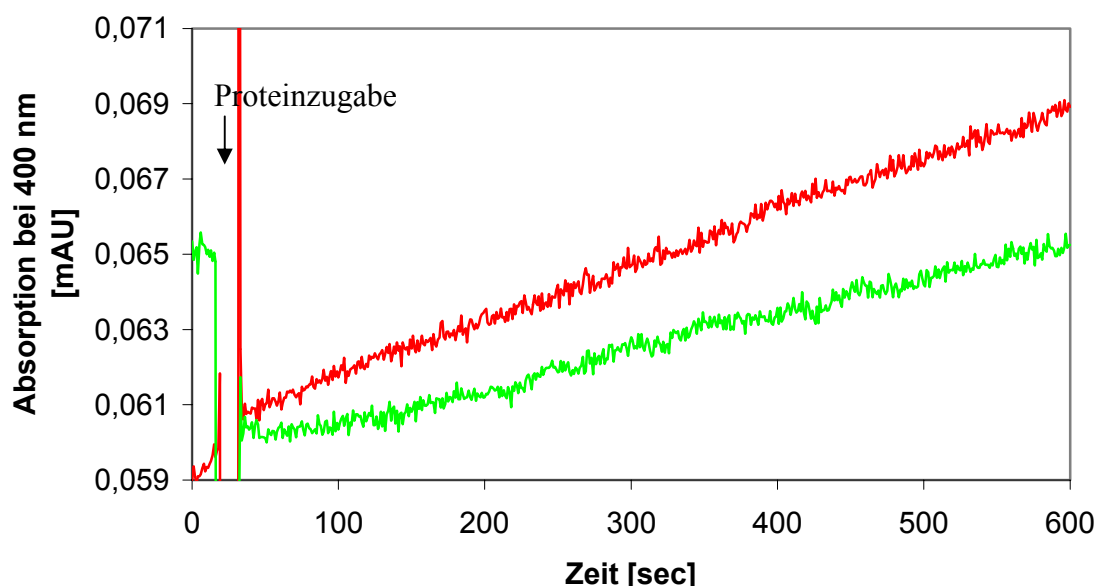
Das Glutamin 116 gehört zu den in allen GluTRs hochkonservierten Aminosäuren (Abbildung 22). Eine Ausnahme bildet jedoch die GluTR aus *M. kandleri*, denn an der entsprechenden Position befindet sich bei diesem Enzym ein Glutamat (Abbildung 22). Die durch HPLC-Analysen gezeigte Freisetzung von Glutamat aufgrund der Esterase-Aktivität der Q116L-Variante weist darauf hin, dass die Glu-tRNA<sup>Glu</sup>-Erkennung nur in geringem Maß beeinflusst wird. Allerdings erfolgt keine Reduktion des gebundenen Glutamats zu GSA. Glutamin 116 wird daher nicht für die Substraterkennung oder für die Bildung des Enzym-gebundenen Zwischenprodukts benötigt. Der folgende Hydridtransfer kann jedoch nicht stattfinden. Diese Ergebnisse zeigen, dass Glutamin 116 an der NADPH-abhängigen Reduktion des Thioester-Zwischenprodukts beteiligt ist.

Zur weiteren Analyse der Funktion von Glutamin 116 wurde die postulierte Bewegung der NADPH-Domäne in Richtung der katalytischen Domäne *in silico* modelliert. Dabei wurde ersichtlich, dass durch diese Bewegung NADPH in direkter Nähe zum Substratanalogon Glutamycin positioniert wird. Somit findet während der Reduktion vermutlich ein direkter Hydridtransfer von NADPH zum Thioester-Zwischenprodukt statt. Das Glutamin 116 befindet sich nach der modellierten Bewegung der NADPH-Domäne in der Nähe zur Nikotinamid-Gruppe des NADPH. Aus diesen Ergebnissen wurde gefolgert, dass Glutamin 116 nicht direkt beim Hydridtransfer involviert ist. Seine Funktion liegt stattdessen vermutlich in der Positionierung des Nikotinamids nach der Bewegung der NADPH-Domäne der GluTR, um einen möglichst effektiven Hydridtransfer zu gewährleisten.

### **3.2.2 Bestimmung der Glutamyl-tRNA Reduktase Esterase-Aktivität mittels 4-Nitrophenylacetat**

Zur Bestimmung der Esterase-Aktivität der GluTR wurde in unserer Arbeitsgruppe bisher der Aktivitätstest mit dem Substrat [<sup>14</sup>C]Glu-tRNA<sup>Glu</sup> in Abwesenheit von NADPH verwendet (Depletionstest). Da für diesen Test das Substrat in einer zeitaufwendigen Prozedur hergestellt werden muss, und auch die Detektion der Aktivität nicht kontinuierlich erfolgen kann, sollte in dieser Arbeit eine neue Methode zur Bestimmung der Esterase-Aktivität der GluTR etabliert werden. Um die Detektion der Aktivität zu erleichtern wurde nach einem Esterasesubstrat gesucht, dessen Umsatz zu einem Produkt führt, welches leicht spektroskopisch verfolgt werden kann.

Ein gut etabliertes Testsystem für die Analyse der Aktivität von Esterasen basiert auf der Bildung von Nitrophenol ausgehend von 4-Nitrophenylacetat, welches leicht spektroskopisch verfolgt werden kann. Doch konnte dieses System bisher nicht erfolgreich für die Bestimmung der Esterase-Aktivität der *M. kandleri* GluTR eingesetzt werden. Ein großes Problem bei den bisherigen Versuchen war die spontane Substrathydrolyse. Durch den Einsatz eines Zweistrahlphotometers konnte jedoch parallel zur GluTR Reaktion eine entsprechende Hintergrundreaktion vermessen werden und so die spontane Substrathydrolyse direkt von der enzymkatalysierten Reaktion abgezogen werden (Abbildung 24). Dadurch konnte erstmals in unserer Arbeitsgruppe dieses Testsystem zur Bestimmung der Esterase-Aktivität der GluTR etabliert werden.



**Abbildung 24: Bestimmung der Glutamyl-tRNA Reduktase Esterase-Aktivität mittels 4-Nitrophenylacetat.**

Die Bildung von Nitrophenol ausgehend von 4-Nitrophenylacetat wurde durch Messung der Absorption bei 400 nm in einem Zweistrahlphotometer verfolgt. Die entsprechende Hintergrundreaktion wurde dabei direkt von der GluTR Reaktion subtrahiert. In einem 600 µl Ansatz wurden 1,6 µM 4-Nitrophenylacetat in Nitrophenol-Assay-Puffer bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Reaktionsstart wurden nach 1 min verschiedene Mengen GluTR gegeben (Pfeil) und die Reaktion über weitere 10 min verfolgt.

Rot: Nitrophenol Bildung durch 8 µg GluTR

Grün: Nitrophenol Bildung durch 2 µg GluTR.

Bei dem verwendeten 4-Nitrophenylacetat handelt es sich um ein minimales GluTR-Substrat. Die geringe Größe des Acetat-Teils ermöglicht, dass die Bildung des Thioesters unabhängig von der Interaktion der Aminosäuren der Substratbindungstasche mit dem Glutamat-Teil der Glu-tRNA<sup>Glu</sup> untersucht werden kann. Durch die

Verwendung der entsprechenden GluTR-Varianten kann nun die Funktion der individuellen Aminosäurereste des aktiven Zentrums während der Katalyse analysiert werden.

Wie Tabelle 4 zeigt, sind die GluTR-Varianten S109A, T49V, H99N, E54K, R52K, R52Q und Q116L in der Lage das artifizielle Substrat zu hydrolysieren. Dabei wurde für keine dieser Mutanten eine deutlich verringerte Esterase-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp beobachtet. Für die Mutante C50S hingegen konnte keine messbare Aktivität detektiert werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Aminosäurereste Serin 109, Threonin 49, Histidin 99, Glutamat 54, Arginin 52 und Glutamin 116 zwar für die Erkennung des natürlichen Substrats von essentieller Bedeutung sind, sie sind jedoch nicht essentiell für die Erkennung des minimalen Substrats 4-Nitrophenylacetat. Cystein 50 hingegen wird sowohl für die Umsetzung des natürlichen Substrats Glu-tRNA<sup>Glu</sup>, als auch für die Umsetzung des artifiziellen Substrats 4-Nitrophenylacetat benötigt. Vermutlich verläuft auch die Hydrolyse des 4-Nitrophenylacetats über ein kovalentes Zwischenprodukt unter Beteiligung von Cystein 50.

**Tabelle 4: Bestimmung der Glutamyl-tRNA Reduktase Esterase-Aktivität mittels 4-Nitrophenylacetat.**

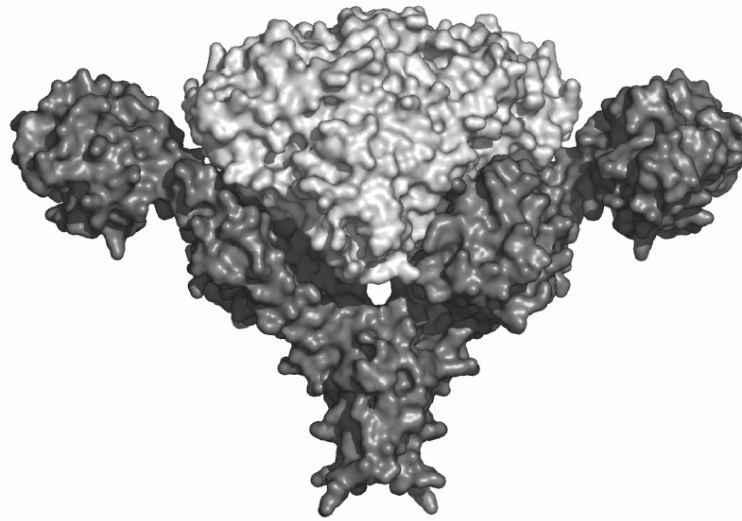
Die Bildung des Nitrophenols wurde bei 400 nm in einem Zweistrahlphotometer detektiert. Die 600 µl Ansätze enthielten 1.6 µM 4-Nitrophenylacetat in Nitrophenol-Assay-Puffer und wurden 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Reaktionsstart wurden 5 µl einer 19.2 µM GluTR-Lösung hinzugegeben und die Reaktion über weitere 10 min verfolgt. Die entsprechende Hintergrundreaktion wurde dabei direkt von der GluTR-Reaktion subtrahiert. Die Aktivität der GluTR-Varianten wurde in Relation zu der des Wildtyp-Enzyms (100 %) gesetzt. n.m.: nicht messbar.

| Enzym | Esterase-Aktivität [%] |
|-------|------------------------|
| wt    | 100 ± 9                |
| S109A | 102 ± 11               |
| T49V  | 94 ± 16                |
| H99N  | 68 ± 14                |
| E54K  | 105 ± 8                |
| R52K  | 62 ± 16                |
| R52Q  | 68 ± 9                 |
| Q116L | 93 ± 2                 |
| C50S  | n.m.                   |

### 3.3 Charakterisierung des GluTR/GSA-AM Komplexes

Die Bildung von ALA, dem Vorläufermolekül aller Tetrapyrrole, benötigt die gemeinsame Aktivität der GluTR und der GSA-AM. Diese beiden Enzyme sind durch den sehr reaktiven Aldehyd GSA miteinander verbunden. In wässriger Umgebung und bei physiologischem pH-Wert besitzt GSA eine Halbwertszeit von nur 4 min (Hoover *et al.*, 1988). Diese mangelnde Stabilität kann zur Degradation des Aldehyds oder zur Bildung von möglicherweise toxischen Produkten führen. Eine Möglichkeit den Kontakt eines instabilen Zwischenprodukts mit der wässrigen Umgebung zu minimieren, wird als „metabolic channeling“ bezeichnet. Dabei werden die instabilen Zwischenprodukte durch spezifische Protein-Protein-Interaktionen direkt von einem Enzym zum anderen weitergeleitet (Geck & Kirsch, 1999; Massant *et al.*, 2002, Purcarea *et al.*, 2003). Um eine möglichst effiziente ALA-Bildung zu gewährleisten, wurde nun dieses „metabolic channeling“ auch für den GSA von der GluTR zur GSA-AM postuliert (Moser *et al.*, 2001). Diese Hypothese wurde durch ein *in silico* Modell des Komplexes zwischen der GluTR und der GSA-AM unterstützt (Abbildung 10). Aufgrund der ungewöhnlichen V-förmigen Struktur der dimeren GluTR aus *M. kandleri* konnte die ebenfalls dimere GSA-AM aus *Synechococcus* sp. direkt in den zwischen den beiden GluTR-Monomeren entstehenden Zwischenraum eingefügt werden (Moser *et al.*, 2001). Obwohl die beiden Enzyme aus verschiedenen Organismen stammten, konnte eine bemerkenswert hohe Oberflächenkomplementarität festgestellt werden. Basierend auf diesem Modell wurde auch ein *in silico* Modell für die Interaktion zwischen den beiden entsprechenden Proteinen aus *E. coli* erstellt (Abbildung 25), die im Folgenden näher untersucht werden sollten.

Sowohl im heterologen als auch im homologen Modell konnte zusätzlich die tRNA<sup>Glu</sup> ohne sterische Konflikte zum resultierenden ternären Komplex eingefügt werden (Abbildung 10). Weiterhin wurde ersichtlich, dass auch die GSA-AM und die tRNA<sup>Glu</sup> eine ausgedehnte Interaktionsfläche besitzen, so dass der ternäre Komplex vermutlich durch die wechselseitige Erkennung zwischen den drei Komponenten zusätzlich stabilisiert wird.



**Abbildung 25: Dreidimensionales Modell des *Escherichia coli* GluTR/GSA-AM Komplexes.**

Die GluTR ist in dunkelgrau und die GSA-AM in hellgrau dargestellt (Lüer *et al.*, 2005). Beide Strukturen repräsentieren die Enzyme aus *E. coli*, die anhand ihrer Aminosäuresequenz und basierend auf den Kristallstrukturen der GluTR aus *M. kandleri* (Moser *et al.*, 2001) beziehungsweise der GSA-AM aus *Synechococcus* sp. (Henning *et al.*, 1997) erstellt wurden.

Ein weiteres auffälliges Merkmal des *in silico* Modells ist die Tatsache, dass der mutmaßliche Eingang zum aktiven Zentrum jedes GSA-AM Monomers direkt gegenüber einer teilweise geöffneten Vertiefung der katalytischen Domäne der GluTR positioniert ist. Das aktive Zentrum der GluTR wird hierbei nur von einem Aminosäurerest von dieser Vertiefung getrennt: Arginin 52. Dieser „Hinterausgang“ der GluTR ermöglicht, dass der reaktive Aldehyd GSA direkt von der GluTR zur GSA-AM weitergeleitet wird, ohne dass er mit der wässrigen Umgebung in Kontakt kommt. Die beobachtete Flexibilität der Region um Arginin 52 ist vermutlich die Voraussetzung für eine effiziente Weiterleitung des GSA, da der postulierte Weg des GSA teilweise durch Arginin 52 blockiert wird. Die dadurch bedingte Konformationsänderung erfordert möglicherweise die strukturelle Umorientierung der Substratbindungstasche in diesem Bereich.

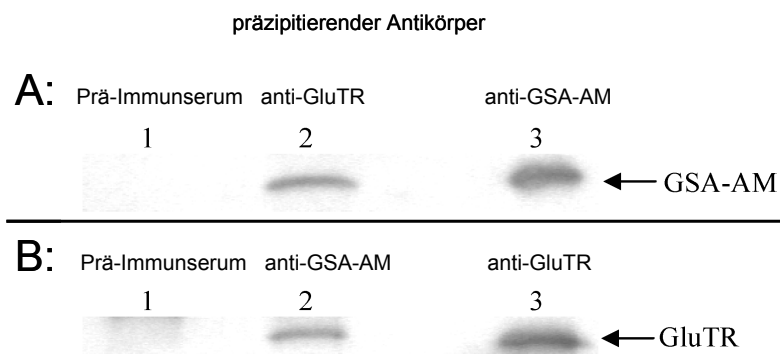
Die Interaktion zwischen der GluTR und der GSA-AM konnte erstmals in der Arbeit von Dr. Stefan Schauer durch Co-Immunopräzipitation des Komplexes mit anti-GluTR Antikörpern aus einem zellfreien *E. coli* Extrakt nachgewiesen werden (Schauer, 2003). In der vorliegenden Arbeit sollte die Komplexbildung verifiziert und genauer charakterisiert werden.

### 3.3.1 *In vivo* Co-Immunopräzipitation

Aus früheren Arbeiten zum Nachweis des GluTR/GSA-AM Komplexes war bekannt, dass die beiden Komplexpartner wahrscheinlich nur schwache Wechselwirkungen miteinander eingehen, und der Komplex selbst nur von transientser Natur ist. Somit blieben Versuche, diesen Komplex mittels nativer PAGE und Gelpermeationschromatographie nachzuweisen, erfolglos.

Der erste Nachweis des GluTR/GSA-AM Komplexes gelang schließlich durch Co-Immunopräzipitation der beiden Proteine aus zellfreien *E. coli* Extrakten (Schauer, 2003). Bei diesen *in vivo* Co-Immunopräzipitationsversuchen wurde der Komplex unter natürlichen Bedingungen nachgewiesen, d. h. es wurden weder rekombinant überproduzierte Proteine verwendet noch wurde der Komplex durch chemische Agenzien wie z. B. Cross-linker modifiziert.

Basierend auf diesen ersten Ergebnissen wurden in der hier vorliegenden Arbeit verschiedene Bedingungen variiert, um die Komplexbildung *in vivo* näher zu untersuchen.



**Abbildung 26: Analyse der Co-Immunopräzipitation des GluTR/GSA-AM Komplexes aus zellfreiem *Escherichia coli* Extrakt mittels Westernblot.**

Die Proteine in 300 µl eines *E. coli* (BL21(λDE3)) zellfreien Extrakts (50 mg/ml Gesamtproteinkonzentration) wurden mit Protein A Sepharose und den folgenden Antikörpern präzipitiert: Bild A, Spur 1: 2.5 µl Kaninchen Prä-Immunsereum (Negativkontrolle). Spur 2: 2.5 µl Kaninchen anti-GluTR. Spur 3: 2.5 µl Kaninchen anti-GSA-AM. Bild B, Spur 1: 2.5 µl Kaninchen Prä-Immunsereum (Negativkontrolle). Spur 2: 2.5 µl Kaninchen anti-GSA-AM. Spur 3: 2.5 µl Kaninchen anti-GluTR. Die gewaschenen Antikörper-Protein Komplexe wurden mit 15 µl SDS-Probenpuffer versetzt und mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE mit 9 %igen Trenngelen aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen und die Komplexbildung zwischen der *E. coli* GluTR und der GSA-AM durch die Detektion des co-präzipitierenden Proteins mit anti-GSA-AM Antikörpern in Bild A und anti-GluTR Antikörpern in Bild B nachgewiesen. Die anti-GSA-AM und anti-GluTR Antikörper wurden nachfolgend über einen sekundären Antikörper (goat-anti-rabbit IgG), an den die Alkalische Phosphatase konjugiert ist, durch Umsatz von NBT und BCIP sichtbar gemacht.

Zunächst wurde überprüft, ob sich der Komplex auch durch Präzipitation mit anti-GSA-AM Antikörpern nachweisen lässt. Hierfür wurden zellfreie *E. coli* Extrakte mit anti-GSA-AM Antikörpern und Protein A Sepharose inkubiert und die präzipitierten Proteine mit anti-GluTR Antikörpern detektiert. Wie in Abbildung 26 zu erkennen ist, kann der Komplex sowohl durch Präzipitation mit den anti-GluTR, als auch mit den anti-GSA-AM Antikörpern nachgewiesen werden.

#### **3.3.1.1 Die Komplexbildung ist abhängig von der Wachstumsphase**

Nachdem gezeigt werden konnte, dass der Komplexnachweis unabhängig vom präzipitierenden Antikörper ist, wurden die verschiedenen Wachstumsphasen einer *E. coli* Kultur hinsichtlich der Komplexbildung untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass sich der Komplex nur in der frühen logarithmischen Wachstumsphase nachweisen lässt. Alle Versuche zur Präzipitation des Komplexes in der späten logarithmischen oder der Stationärphase waren nicht erfolgreich. Die GluTR stellt, wie schon in der Einleitung erwähnt, einen der wichtigsten Regulationspunkte der Tetrapyrrolbiosynthese dar. In den späteren Wachstumsphasen sinkt der zelluläre Häm-Bedarf, demzufolge verringert sich auch die intrazelluläre GluTR Konzentration (Wang *et al.*, 1999). Aufgrund der wahrscheinlich deutlich geringeren GluTR Konzentration ist es nun mit den verwendeten Antikörpern nicht mehr möglich, den Komplex in den späteren Wachstumsphasen nachzuweisen. So lange die Tetrapyrrolbiosynthese jedoch weiter abläuft, ist zu vermuten, dass auch der GluTR/GSA-AM Komplex vorhanden ist, allerdings in deutlich reduzierten Mengen im Vergleich zu der frühen logarithmischen Phase.

#### **3.3.1.2 In dem *hemA*<sup>-</sup>-Stamm EV61 ist kein Komplex nachweisbar**

Um eine unspezifische Präzipitation der GSA-AM auszuschließen, wurden die Co-Immunopräzipitationsversuche ebenfalls mit Zellextrakten des *hemA*<sup>-</sup>-Stamms EV61 durchgeführt. Wie zu erwarten, konnte hier jedoch unter keiner der getesteten Bedingungen der Komplex nachgewiesen werden.

### 3.3.2 *In vitro* Co-Immunopräzipitation

Mit Hilfe der *in vivo* Co-Immunopräzipitationsversuche können keine weiteren Aussagen hinsichtlich der Beteiligung von Substrat und Cofaktoren während der Komplexbildung getroffen werden. Die genauen Voraussetzungen für die Komplexbildung sollten daher mittels *in vitro* Co-Immunopräzipitationsversuchen bestimmt werden. Hierfür wurden die rekombinant produzierten und gereinigten Proteine unter verschiedenen Bedingungen inkubiert und analog zu den *in vivo* Experimenten mit den beiden Antikörpern präzipitiert und im Westernblot nachgewiesen.

#### 3.3.2.1 Die Komplexbildung ist Temperatur tolerant

Zunächst wurden die Ansätze bei unterschiedlichen Temperaturen vorinkubiert. Die anschließende Präzipitation der gebildeten Komplexe erfolgte unter identischen Bedingungen. Dabei konnte jedoch kein Unterschied in der präzipitierten Proteinmenge zwischen den beiden Vorinkubationstemperaturen (4 °C und 37 °C) festgestellt werden. Hieraus lässt sich schließen, dass die Komplexbildung von der Temperatur unabhängig erfolgt.

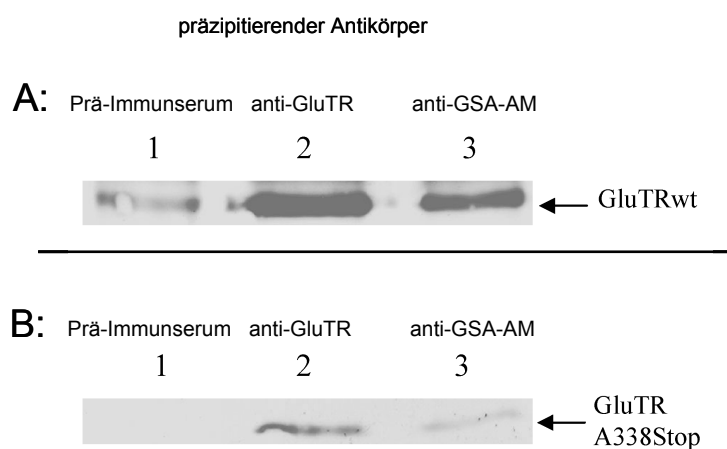
#### 3.3.2.2 Die Bedeutung des Substrats und der Cofaktoren für die Komplexbildung

Einige Protein-Protein-Wechselwirkungen sind abhängig von der Aktivität der Enzyme und werden durch die Cofaktoren der Enzyme und den weitergeleiteten Metaboliten reguliert (Hoskins *et al.*, 2004; Yong *et al.*, 1993). Außerdem wurde ausgehend von dem ternären Modell des GluTR/GSA-AM Komplexes vermutet, dass die tRNA für die Komplexbildung von Bedeutung ist. Daher wurden Versuche zur möglichen Funktion der tRNA und der beiden Cofaktoren, NADPH für die GluTR und PLP für die GSA-AM, während der Komplexbildung durchgeführt. Unter den untersuchten Bedingungen hatte jedoch weder die Anwesenheit der tRNA noch das Vorhandensein der Cofaktoren Einfluss auf die präzipitierte Komplexmenge. Die Komplexbildung zwischen der GluTR und der GSA-AM erfolgt demnach unabhängig vom Metabolitenfluss zwischen den beiden Enzymen. Demzufolge scheint auch die Aktivität der Enzyme für die Komplexbildung nicht essentiell zu sein.



### 3.3.2.3 Die Komplexbildung wird durch die Dimerisierung der Glutamyl-tRNA Reduktase unterstützt

Das charakteristische Merkmal der GluTR ist ihre V-förmige Struktur. Zur Untersuchung der Bedeutung der V-förmigen dimeren Struktur auf die Komplexbildung wurde eine GluTR-Variante konstruiert, bei der vor der Dimerisierungsdomäne ein Stopp-Codon eingefügt wurde. Diese GluTR-Variante (GluTRA338Stop) ist nun nicht mehr in der Lage, ein Dimer zu bilden (siehe 3.1.4). In den *in vitro* Co-Immunopräzipitationsansätzen wurde nun anstelle der dimeren GluTR die monomere Form eingesetzt.



**Abbildung 27: Westernblot Analyse der *in vitro* Co-Immunopräzipitation der rekombinant produzierten und gereinigten *Escherichia coli* GluTR und Glutamat-1-semialdehyd-2,1-Aminomutase.**

Die *E. coli* GluTRwt in Bild A und GluTRA338Stop in Bild B wurden mit GSA-AM (alle Proteine mit einer Konzentration von 1  $\mu$ M) ohne Substrat und ohne Cofaktoren für 10 min bei 4 °C in 100  $\mu$ l Assay-Puffer inkubiert. Die Immunopräzipitation wurde mit folgenden Antikörpern durchgeführt: Bild A und B, Spur 1, 1  $\mu$ l Kaninchen Prä-Immunserum (Negativkontrolle). Spur 2: 1  $\mu$ l Kaninchen anti-GluTR. Spur 3: 1  $\mu$ l Kaninchen anti-GSA-AM. Die gewaschenen Antikörper-Protein Komplexe wurden mit 15  $\mu$ l SDS-Probenpuffer versetzt und mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE mit 9 %igen Trenngelen aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen und die Komplexbildung zwischen der *E. coli* GluTR und der GSA-AM wurde durch die Detektion des co-präzipitierenden Proteins mit anti-GluTR Antikörpern in Bild A und B gezeigt. Die anti-GSA-AM und anti-GluTR Antikörper wurden nachfolgend über einen sekundären Antikörper (goat-anti-rabbit IgG), an den die Alkalische Phosphatase konjugiert ist, durch Umsatz von NBT und BCIP sichtbar gemacht. Die Menge an präzipitierter GluTR mit anti-GSA-AM Antikörpern verglichen mit der präzipitierten GluTR mit den anti-GluTR Antikörpern ist im Falle der GluTRA338Stop wesentlich geringer.

Im Vergleich zur Wildtyp-GluTR wird hierbei signifikant weniger Komplex gebildet (Abbildung 27). Nur 20 % der eingesetzten GluTRA338Stop bilden mit der GSA-AM einen Komplex (im Vergleich dazu bilden 50 % des Dimers einen Komplex). Somit zeigt sich, dass die dimere V-förmige Struktur der GluTR eine entscheidende

Voraussetzung für die Komplexbildung ist. Allerdings beruht die Komplexbildung nicht allein auf der V-förmigen Struktur sondern auch die monomere GluTR-Variante besitzt noch eine ausreichende Affinität für die Interaktion mit der GSA-AM.

### 3.3.3 Identifizierung weiterer Protein-Interaktionspartner der Glutamyl-tRNA Reduktase

Neben der Interaktion zwischen der GluTR und der GSA-AM wurde vor einigen Jahren auch die Interaktion zwischen der GluTR und der GluRS mit den Enzymen aus *Chlamydomonas reinhardtii* nachgewiesen (Jahn, 1992). Die Wechselwirkung zwischen diesen beiden Enzymen könnte eine wichtige Rolle bei der Kontrolle des Metabolitenflusses für Glu-tRNA<sup>Glu</sup> hin zur Protein- bzw. zur Tetrapyrrolbiosynthese spielen. Die intrazelluläre Konzentration an freien aminoacylierten tRNAs ist sehr gering, da diese überwiegend als ternäre Komplexe in der Form von EF-Tu/aatRNA/GTP vorliegen (Clark & Nyborg, 1997; Nissen *et al.*, 1996; Berchtold *et al.*, 1993). Durch die Interaktion von GluTR und GluRS könnte die Konkurrenz der *in vivo* nur in sehr geringen Konzentrationen vorliegenden GluTR mit den reichlich vorhandenen Komponenten der Proteinbiosynthese um das Substrat Glu-tRNA<sup>Glu</sup> verhindert werden.

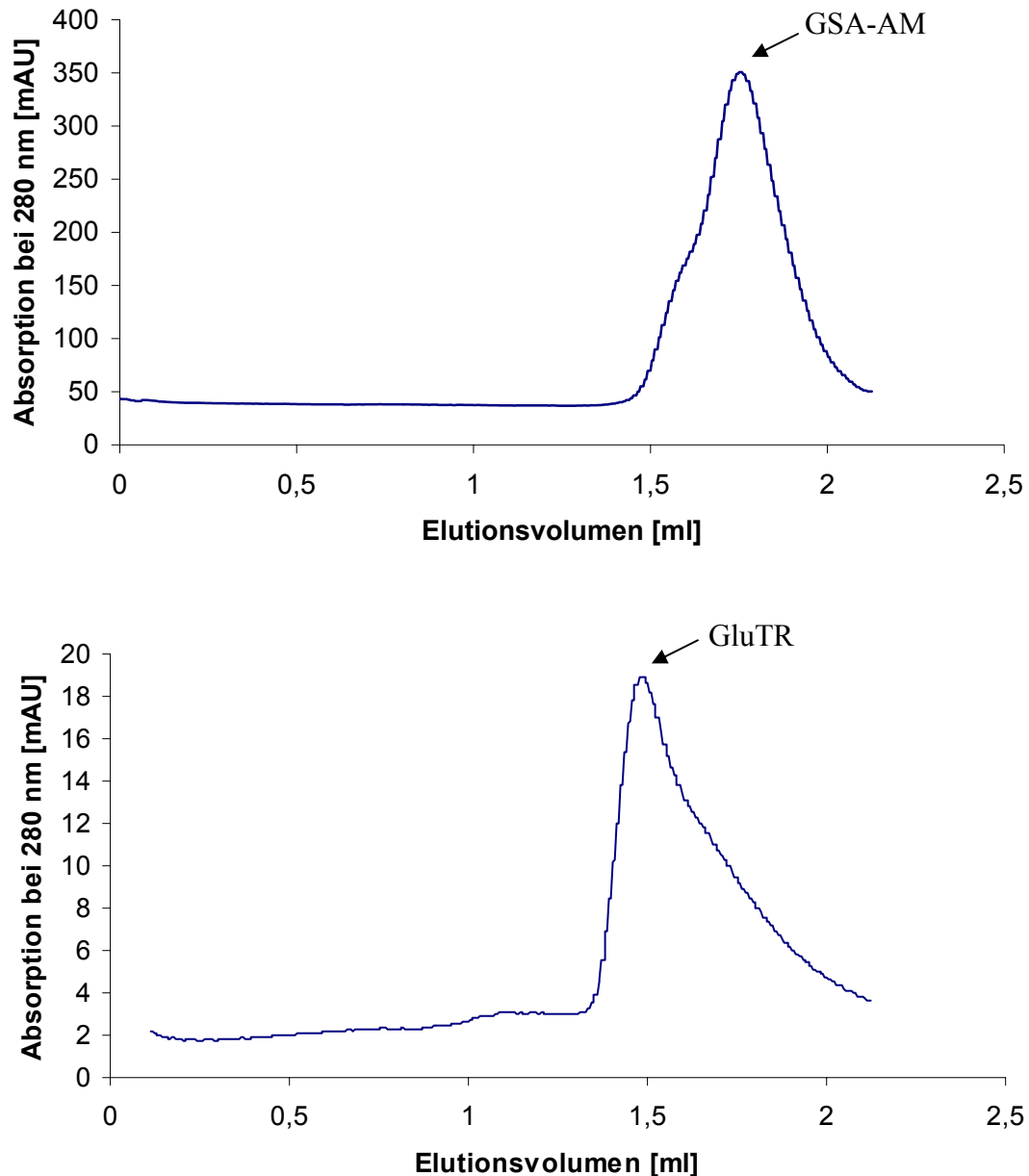
Für die Analyse einer möglichen Interaktion zwischen der GluTR und der GluRS wurden Antikörper gegen die rekombinant produzierte und gereinigte *E. coli* GluRS hergestellt. Diese Antikörper wurden in verschiedenen Co-Immunopräzipitationsversuchen eingesetzt. Hierbei erwies sich jedoch das Molekulargewicht der *E. coli* GluRS als problematisch, da sich die *E. coli* GluRS im SDS-Gel nicht von den schweren Ketten der präzipitierenden Antikörper unterscheiden lässt. Aus diesem Grund wurde versucht, die interagierenden Proteine *in vivo* mit Hilfe von Formaldehyd kovalent zu vernetzen, um im SDS-Gel einen höhermolekularen Komplex detektieren zu können. Ein solcher Komplex, der eine Interaktion zwischen der GluTR und der GluRS zeigen würde, konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Auch die Versuche die Antikörper kovalent an die zur Präzipitation verwendete Protein A Sepharose zu binden, um die Detektion der GluRS nach der Co-Immunopräzipitation zu ermöglichen, waren erfolglos.

### 3.3.4 Bestimmung der Bindungskonstante mittels Hummel/Dreyer für den GluTR/GSA-AM Komplex

Zur näheren Charakterisierung des GluTR/GSA-AM Komplexes sollte dessen Bindungskonstante bestimmt werden. Die besondere Herausforderung hierbei war, neben der Instabilität und der Aggregationsneigung der *E. coli* GluTR, die Hypothese, dass nur eine schwache Wechselwirkung zwischen den beiden Enzymen vorhanden ist. Unter diesen Bedingungen erschien daher die Bestimmung der Bindungskonstante mittels der Hummel/Dreyer Methode als besonders geeignet, denn diese Methode bietet sich vor allem bei der Analyse schwacher Protein-Protein-Interaktionen an (Hummel & Dreyer, 1962; Gibson *et al.*, 2003). Da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass die Komplexbildung unabhängig von der Anwesenheit des Substrats und der Cofaktoren ist, konnten die nachfolgenden Analysen ohne Substrat und Cofaktoren durchgeführt werden.

Für die Durchführung der Hummel/Dreyer Analysen wird einer der Interaktionspartner in relativ großen Mengen benötigt, da eine Gelfiltrationssäule mit einem Protein äquilibriert wird. Die rekombinant produzierte *E. coli* GluTR wurde durch Rückfaltung von „inclusion bodies“ gewonnen. Daher war es schwierig, sie in ausreichend großen Mengen zu produzieren. Demzufolge wurde die GSA-AM als Protein ausgewählt, mit welchem die Säule äquilibriert wurde. Trotz des geringen Säulenvolumens (2.4 ml) wurden für eine Versuchsreihe mit 5 Läufen etwa 25 mg des Proteins benötigt. Diese Mengen GSA-AM konnten nur nach einer Optimierung der Produktion und Reinigung der GSA-AM erzielt werden (siehe 3.1.3).

Eine weitere Voraussetzung für die erfolgreiche Durchführung der Gelfiltrationsanalyse sind deutlich unterschiedliche Elutionsvolumen für die zu untersuchenden Interaktionspartner. Obwohl die GluTR und die GSA-AM ähnliche Molekulargewichte besitzen, zeigt die GluTR aufgrund ihrer V-förmigen, nicht globulären Struktur ein deutlich kleineres Elutionsvolumen gegenüber der GSA-AM (Abbildung 28). Die GSA-AM eluierte spezifisch bei 1.7 ml, die GluTR eluierte reproduzierbar bei 1.5 ml. Somit waren sämtliche Voraussetzungen für die Durchführung der Hummel/Dreyer Analyse erfüllt.

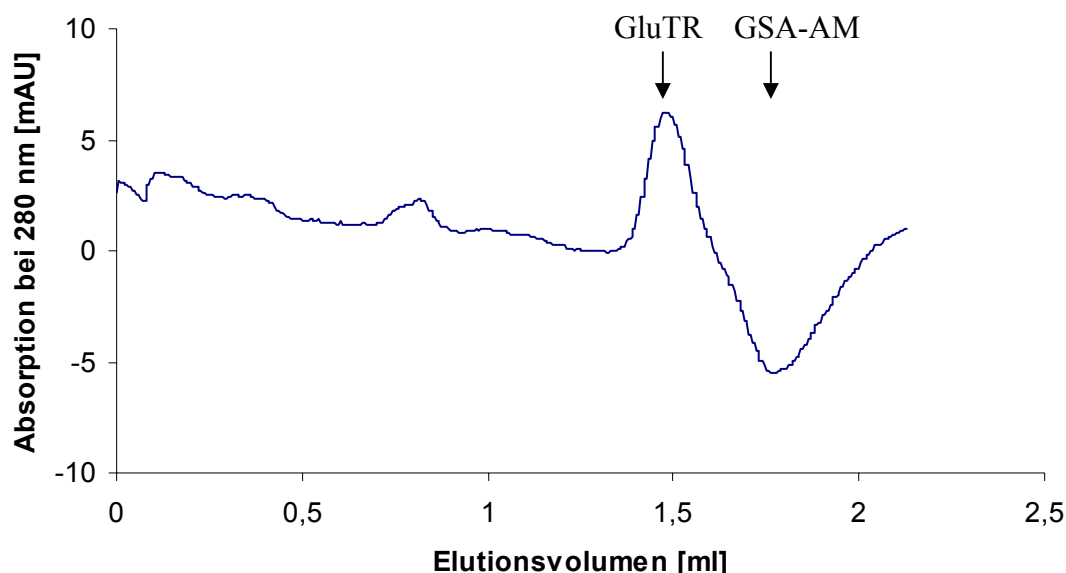


**Abbildung 28: Gelfiltrationsanalysen der *Escherichia coli* Glutamat-1-semialdehyd-2,1-Aminomutase (oben) und der Glutamyl-tRNA Reduktase (unten) zur Bestimmung der Elutionsvolumen.**

Zur Bestimmung der Elutionsvolumen der GluTR und der GSA-AM wurden die Proteine mittels einer analytischen Superdex 200 (PC 3.2/30) in Hummel/Dreyer-Puffer bei einer Flussrate von 100  $\mu\text{l}/\text{min}$  getrennt. Die Elution der Proteine wurde bei einer Wellenlänge von 280 nm verfolgt. Die GluTR eluiert reproduzierbar bei ca. 1.5 ml, obwohl sie ein ähnliches Molekulargewicht wie die GSA-AM besitzt. Die GSA-AM eluiert spezifisch bei 1.7 ml.

Nach dem Äquilibrieren der Säule mit 10  $\mu\text{M}$  GSA-AM wurden verschiedene Mengen (2 - 20  $\mu\text{M}$ ) GluTR, die jeweils genau 10  $\mu\text{M}$  GSA-AM enthielten, injiziert. Durch die Interaktion der beiden Proteine verringert sich die Konzentration an freier GSA-AM, wodurch ein Tal in der Absorption bei dem entsprechenden Elutionsvolumen entsteht

(Abbildung 29). Durch die Erhöhung der injizierten GluTR-Konzentration wird eine proportionale Vergrößerung des Tals beobachtet. Weder bei der Injektion einer Probe ohne GluTR, noch bei der Injektion von BSA anstelle der GluTR ist dieses Tal zu beobachten.



**Abbildung 29: Gelfiltrationsanalyse des *Escherichia coli* GluTR/GSA-AM Komplexes nach Hummel/Dreyer.**

Gezeigt ist die Gelfiltrationschromatographie mit einer Superdex 200 (PC 3.2/30), die mit Hummel/Dreyer-Puffer mit 10  $\mu$ M GSA-AM äquilibriert wurde. Eine 20  $\mu$ l Probe mit 10  $\mu$ M GluTR und 10  $\mu$ M GSA-AM wurde mit einer Flussrate von 100  $\mu$ l/min chromatographiert. Die Elution der Proteine wurde bei einer Wellenlänge von 280 nm verfolgt. Die Pfeile markieren die Elutionsvolumen der GluTR bzw. der GSA-AM. An der Elutionsposition der GSA-AM ist ein Tal in der Absorption zu beobachten, das auf die GSA-AM/GluTR Interaktion zurückzuführen ist.

Nach Gelfiltrationsläufen mit verschiedenen Proteinkonzentrationen wurde die Bindungskonstante für die GluTR/GSA-AM Interaktion analog zur Interaktionen der Sensorkinase CheA und CheW mit Hilfe der internen Kalibrierung berechnet (Gegner *et al.*, 1991). Für den GluTR/GSA-AM Komplex wurde dabei eine Bindungskonstante von 10  $\mu$ M errechnet. In der Literatur werden Komplexe mit Bindungskonstanten  $\geq 1 \mu$ M als schwache Komplexe bezeichnet. Die meisten Protein-Protein-Interaktionen mit Bindungskonstanten ähnlicher Größenordnung finden sich in Signaltransduktionswegen und Elektronentransfersystemen, bei denen eine transiente Interaktion wichtige regulatorische Funktion erfüllt.

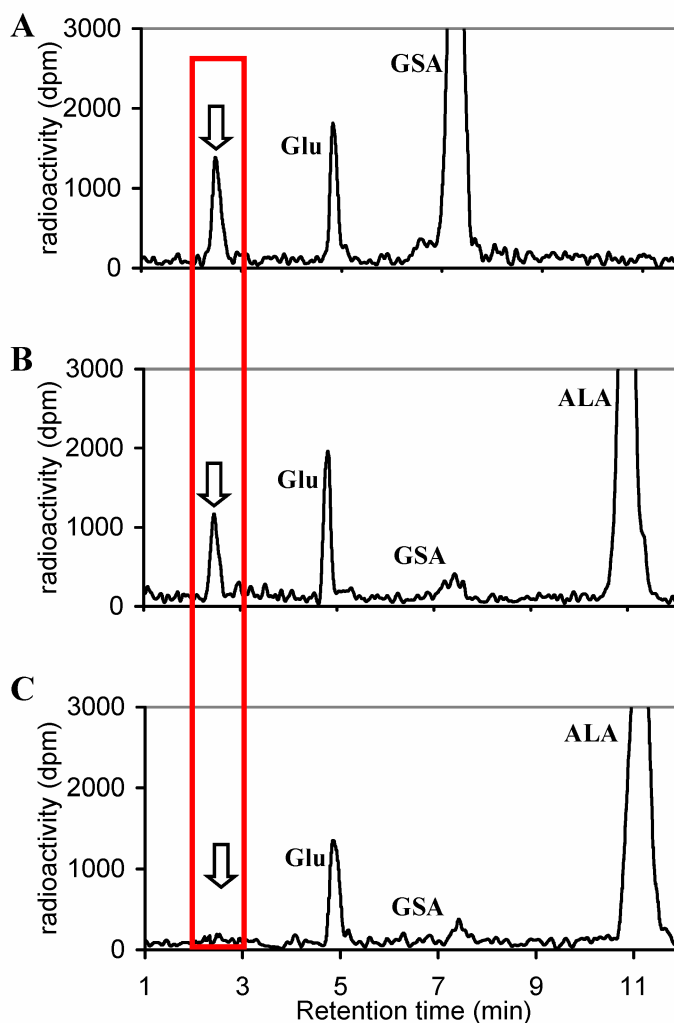
Weiterhin besitzen auch Protein-Protein-Interaktionen, die als Folge des „metabolic channeling“ auftreten, eine Bindungskonstante  $\geq 1 \mu$ M (Purcarea *et al.*, 2003). Folglich stellt also auch die Bindungskonstante des GluTR/GSA-AM Komplexes einen weiteren Hinweis für das „metabolic channeling“ zwischen der GluTR und der GSA-AM dar.

### 3.3.5 „Metabolic channeling“-Funktion des GluTR/GSA-AM Komplexes

Nachdem nun die Interaktion zwischen der GluTR und der GSA-AM nachgewiesen werden konnte, sollte die Funktion des Komplexes näher untersucht werden.

Im Allgemeinen ermöglichen Protein-Protein-Wechselwirkungen von zwei im Stoffwechselweg aufeinander folgenden Enzymen den direkten Transfer des Zwischenprodukts vom aktiven Zentrum eines Enzyms zum aktiven Zentrum des folgenden Enzyms (Nooren & Thornton, 2003; Spivey & Ovadi, 1999). Dieses sogenannte „metabolic channeling“ ist besonders häufig für instabile Zwischenprodukte zu beobachten, da diese zum einen so nicht in Kontakt mit der Umgebung kommen (Rudolph & Stubbe, 1995) und zum anderen die Zeit für den Transfer von einem Enzym zum anderen deutlich verkürzt ist (Easterby, 1981). Beispiele hierfür finden sich in vielen verschiedenen Stoffwechselwegen, wie der Purin- und Pyrimidinsynthese, dem Amino- und Fettsäuremetabolismus, der Glykolyse, dem Zitronensäurezyklus, der DNA-Replikation, der RNA-Synthese und der Proteinbiosynthese (Mathews & Sinha, 1982; Wakil *et al.*, 1983; Srere, 1987; Batke, 1989).

Um das „metabolic channeling“ für den GluTR/GSA-AM Komplex zu verifizieren, wurde die enzymatische Umwandlung von [ $^{14}\text{C}$ ]Glu-tRNA<sup>Glu</sup> in [ $^{14}\text{C}$ ]ALA zum einen in zwei aufeinander folgenden Reaktionen und zum anderen in einer gekoppelten Reaktion, bei der beide Komplexpartner gleichzeitig anwesend waren, untersucht. Die resultierenden radioaktiven Reaktionsprodukte wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, mittels HPLC analysiert. Dabei konnte beobachtet werden, dass bei den Reaktionsansätzen in denen nur die GluTR vorhanden war, neben dem GSA und dem durch spontane Substrathydrolyse entstehenden Glutamats, eine weitere radioaktiv markierte Substanz vorhanden war. Diese Substanz konnte im Gegensatz zum GSA nicht von der GSA-AM zu ALA umgesetzt werden. In den gekoppelten Reaktionsansätzen hingegen, die die Komplexbildung vor der Substratzugabe erlaubten, wurde in keinem Fall diese zusätzliche Substanz detektiert (Abbildung 30).



**Abbildung 30: Verhinderung der Bildung von nicht enzymatisch umsetzbaren Nebenprodukten während der ALA-Biosynthese durch „metabolic channeling“.**

Die Reaktionsprodukte, die ausgehend von  $[^{14}\text{C}]\text{Glu-tRNA}^{\text{Glu}}$  in verschiedenen Reaktionsansätzen gebildet wurden, wurden mittels HPLC-Chromatographie bei einer Flussrate von 0.7 ml/min mit einer Waters  $\mu\text{Bondapak}^{\text{TM}} \text{C}_{18}$ -Säule (3.9 x 150 nm, 125 Å Porengröße, 10  $\mu\text{m}$  Partikeldurchmesser) getrennt. Die Analyse wurde mittels eines Durchfluss-Szintillationszählers durchgeführt. A: Trennung der Produkte der GluTR Reaktion mit  $[^{14}\text{C}]\text{Glu-tRNA}^{\text{Glu}}$ . Die unbekannte radioaktive Substanz ist durch einen Pfeil markiert. B: Die Reaktionsprodukte von A wurden zur Umwandlung in  $[^{14}\text{C}]\text{ALA}$  weiter mit der GSA-AM inkubiert. Dabei wurde die unbekannte Substanz nicht von der GSA-AM umgesetzt. C: Gekoppelter Assay mit dem GluTR/GSA-AM Komplex und  $[^{14}\text{C}]\text{Glu-tRNA}^{\text{Glu}}$ . In diesem Ansatz ist keine zusätzliche unbekannte Substanz detektierbar.

Bei der chemischen Synthese des GSA wurde bereits vor einigen Jahren die spontane Zyklisierung des GSA zu 2-Hydroxy-3-aminotetrahydropyran-1-on beobachtet (Jordan, 1990). Aufgrund der geringen Mengen ( $< 5 \text{ pmol}$ ) war jedoch eine Charakterisierung der unbekannten Substanz nicht möglich. Es wurde allerdings vermutet, dass es sich bei der beobachteten Substanz mit einem Elutionsvolumen von 1.7 ml möglicherweise um das spontan gebildete 2-Hydroxy-3-aminotetrahydropyran-1-on handelt.

Eine wesentliche Funktion des GluTR/GSA-AM Komplexes scheint die Vermeidung von unerwünschten Nebenreaktionen des GSA durch direkte Weiterleitung („metabolic channeling“) von der GluTR zur GSA-AM zu sein. Durch den Komplex wird eine effiziente ALA-Bildung gewährleistet und die Entstehung von möglicherweise toxischen Nebenprodukten verhindert.

### 3.3.6 Der GluTR/GSA-AM Komplex in *Chlamydomonas reinhardtii*

Im Verlauf dieser Arbeit wurde der GluTR/GSA-AM Komplex auch in *C. reinhardtii* von einer anderen Arbeitsgruppe gezeigt (Nogaj *et al.*, 2005). In dieser Veröffentlichung konnte der Komplex *in vitro* mittels Sucrose Gradientenultrazentrifugation sowie Co-Immunopräzipitation nachgewiesen werden. Die Ultrazentrifugationsanalysen zeigten eine 1:1 Stöchiometrie des Komplexes bestehend aus homodimerer GluTR und homodimerer GSA-AM. Durch Glutaraldehyd cross-linking von *C. reinhardtii*-Zellen wurden die GluTR und die GSA-AM in einem Westernblot als Bestandteil eines hochmolekularen Komplexes nachgewiesen werden. Die anderen Bestandteile dieses Komplexes konnten jedoch nicht identifiziert werden. Hierdurch wurde die Komplexbildung auch *in vivo* bestätigt. Weiterhin wurde in kinetischen Studien die ALA-Bildung aus Glutamyl-tRNA im gekoppelten Enzym-System untersucht. Die Zugabe einer inaktiven GSA-AM-Variante zu einem Reaktionsansatz mit GluTR und Wildtyp-GSA-AM führte zu einer Verringerung der ALA-Bildung. Dieser Ansatz wird klassischer Weise zum Nachweis des „metabolic channeling“ durchgeführt.

Durch den Nachweis des Komplexes in zwei verschiedenen Organismen kann die Komplexbildung zwischen der GluTR und der GSA-AM und das daraus resultierende „metabolic channeling“ als genereller Mechanismus während der Tetrapyrrolbiosynthese in Pflanzen, Archaea und allen Bakterien, die ALA über den C<sub>5</sub>-Syntheseweg synthetisieren, betrachtet werden.



## 4 Zusammenfassung

Die Tetrapyrrolbiosynthese in Pflanzen, Archaea und den meisten Bakterien beginnt mit der NADPH-abhängigen Reduktion von tRNA-gebundenem Glutamat zu Glutamat-1-semialdehyd (GSA), katalysiert durch die Glutamyl-tRNA Reduktase (GluTR). Dieser hochreaktive Aldehyd wird im folgenden Schritt von der Glutamat-1-semialdehyd-2,1-Aminomutase (GSA-AM) zu 5-Aminolävulinsäure (ALA), dem allgemeinen Vorläufermolekül aller Tetrapyrrole, umgewandelt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Wechselwirkung zwischen der *Escherichia coli* GluTR und der GSA-AM mittels Co-Immunoprecipitation und Gelfiltrationsanalysen nachgewiesen werden. Es wurde gezeigt, dass zur Komplexbildung weder Substrate noch beteiligte Cofaktoren benötigt werden. Eine Bindungskonstante des GluTR/GSA-AM Komplexes von 10  $\mu$ M konnte bestimmt werden. Eine wesentliche Funktion des GluTR/GSA-AM Komplexes ist die Vermeidung von unerwünschten Nebenreaktionen des reaktiven GSA mit dem Lösungsmittel, wodurch eine effiziente ALA-Bildung gewährleistet wird. Die Komplexbildung konnte auch für die Enzyme aus *Chlamydomonas reinhardtii* gezeigt werden (Nogaj *et al.*, 2005). Somit ist die beobachtete Protein-Protein-Wechselwirkung und das damit verbundene „metabolic channeling“ von allgemeiner Bedeutung.

Im zweiten Teil der Arbeit konnte durch Mutagenesestudien sechs konservierter Aminosäurereste des aktiven Zentrums der *E. coli* GluTR ein genaues Bild der Erkennung des Glutamat-Teils des Substrats im aktiven Zentrum erstellt werden. Mit Hilfe der misacylierten [ $^{14}$ C]Gln-tRNA<sup>Glu</sup> wurde gezeigt, dass die Erkennung des Glutamats durch Arginin 52 und dem umgebenden Wasserstoffbrückennetzwerk nicht essentiell für die GluTR-Erkennung ist. Eine strukturelle Flexibilität der Region um Arginin 52 wurde abgeleitet. Diese eher unerwarteten Ergebnisse deuten wiederum auf eine Funktion der Aminosäurereste dieses Teils des aktiven Zentrums beim „metabolic channeling“ hin.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Glutamin 116 eine wichtige Funktion bei der Positionierung des NADPH Cofaktors für einen möglichst effektiven Hydridtransfer besitzt. Über das molekulare Verständnis der Funktion der Aminosäurereste im aktiven Zentrum der *E. coli* GluTR wurden neue Ansatzpunkte zur Identifizierung von neuen Inhibitoren und damit zur Entwicklung neuer Antibiotika und Herbizide geschaffen.

## 5     **Ausblick**

Basierend auf dieser ersten Charakterisierung des GluTR/GSA-AM Komplexes sollte zukünftig die Kristallisation des Komplexes angestrebt werden. Anschließend könnte durch ortsgerichtete Mutagenese, basierend auf den durch die Kristallstruktur erhaltenen Informationen, die Interaktionsfläche zwischen beiden Enzymen näher analysiert werden.

Für eine weitergehende Untersuchung des „metabolic channeling“ zwischen der GluTR und der GSA-AM sollten durch ortsgerichtete Mutagenese weitere Aminosäurereste identifiziert werden, welche an der Substratweiterleitung beteiligt sind.

Hinsichtlich der weiteren Aufklärung des enzymatischen Mechanismus der GluTR sollte die postulierte Bewegung der NADPH-Domäne nachgewiesen werden. Ein wichtiger Ansatzpunkt hierfür wäre die Kristallisation der „geschlossenen Konformation“ bzw. der tRNA-gebundenen Form der GluTR.

## 6 Literaturverzeichnis

- Astner, I., Schulze, J. O., van den Heuvel, J., Jahn, D., Schubert, W.-D. & Heinz, D. W. (2005) Crystal structure of 5-aminolevulinate synthase, the first enzyme of heme biosynthesis, and its link to XLSA in humans. *EMBO J.* **24**, 3166-3177.
- Avissar, Y. & Beale, S. I. (1989) Identification of the enzymatic basis for  $\delta$ -aminolevulinic acid auxotrophy in a *hemA* mutant of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **171**, 2919-2924.
- Baltzer, L., Broo, K. S., Nilsson, H. & Nilsson, J. (1999) Designed four-helix bundle catalysts - the engineering of reactive sites for hydrolysis and transesterification reactions of *p*-nitrophenyl esters. *Bioorg. Med. Chem.* **7**, 83-91.
- Banerjee, R. (2003) Radical carbon skeleton rearrangements: catalysis by coenzyme B12-dependent mutases. *Chem. Rev.* **103**, 2083-2094.
- Batke, J. (1989) Channeling of glycolytic intermediates by temporary, stationary bi-enzyme complexes is probable *in vivo*. *Trends Biochem. Sci.* **14**, 481-482.
- Beale, S. I., Gough, S. P. & Granick, S. (1975) Biosynthesis of  $\delta$ -aminolevulinic acid from the intact carbon skeleton of glutamic acid in greening barley. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **72**, 2719-2723.
- Berchtold, H., Reshetnikova, L., Reiser, C. O. A., Schirmer, N. K., Sprinzl, M. & Hilgenfeld, R. (1993) Crystal structure of active elongation factor Tu reveals major domain rearrangements. *Nature* **365**, 126-132.
- Breckau, D., Mahlitz, E., Sauerwald, A., Layer, G. & Jahn, D. (2003) Oxygen-dependent coproporphyrinogen III oxidase (HemF) from *Escherichia coli* is stimulated by manganese. *J. Biol. Chem.* **278**, 46625-46631.
- Breinig, S., Kervinen, J., Stith, L., Wasson, A. S., Fairman, R., Wlodawer, A., Zdanov, A. & Jaffe, E. K. (2003) Control of tetrapyrrole biosynthesis by alternate quaternary forms of porphobilinogen synthase. *Nat. Struc. Biol.* **10**, 757-763.
- Brisson, A., Brun, Y. V., Bell, A. W., Roy, P. H. & Lapointe, J. (1989) Overproduction and domain structure of the glutamyl-tRNA synthetase of *Escherichia coli*. *Biochem. Cell. Biol.* **67**, 404-410.
- Chelikani, P., Fita, I., & Loewen, P. C. (2003) Diversity of structures and properties among catalases. *Cell. Mol. Life Sci.* **61**, 192-208.
- Chen, W., Wright, L., Lee, S., Cosloy, S. D. & Russell, C. S. (1996) Expression of glutamyl-tRNA reductase in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Acta* **1309**, 109-121.
- Chen, M.-W., Jahn, D., O'Neill, G. & Söll, D. (1990) Purification of the glutamyl-tRNA reductase from *Chlamydomonas reinhardtii* involved in  $\delta$ -aminolevulinic acid formation during chlorophyll biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **265**, 4058-4063.

- Clark, B. F. C. & Nyborg, J. (1997) The ternary complex of EF-Tu and its role in protein biosynthesis. *Curr. Opin. Struc. Biol.* **7**, 110-116.
- Cole, J. A., Newman, B. M. & White, P. (1980) Biochemical and genetic characterization of *nirB* mutants of *Escherichia coli* K12 pleiotropically defective in nitrite and sulphite reduction. *J. Gen. Microbiol.* **120**, 475-483.
- Easterby, J. S. (1981) A generalized theory of the transition time for sequential enzyme reactions. *Biochem. J.* **199**, 155-161.
- Eisenthal, R. & Danson, M. J. (2002) *Enzyme Assays: A practical approach*, 2nd edn. Oxford University Press, Oxford, pp. 18-19.
- Erskine, P. T., Norton, E., Cooper, J. B., Lambert, R., Coker, A., Lewis, G., Spencer, P., Sarwar, M., Wood, S. P., Warren, M. J. & Shoolingin-Jordan, P. M. (1999) X-ray structure of 5-aminolevulinic acid dehydratase from *Escherichia coli* complexed with the inhibitor levulinic acid at 2.0 Å resolution. *Biochemistry* **38**, 4266-4276.
- Erskine, P. T., Senior, N., Awan, S., Lambert, R., Lewis, G., Tickle, I. J., Sarwar, M., Spencer, P., Thomas, P., Warren, M. J., Shoolingin-Jordan, P. M., Wood, S. P. & Cooper, J. B. (1997) X-ray structure of 5-aminolaevulinate dehydratase, a hybrid aldolase. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 1025-1031.
- Frankenberg, N., Erskine, P.T., Cooper, J. B., Shoolingin-Jordan, P. M., Jahn, D. & Heinz, D. W. (1999) High resolution crystal structure of a  $Mg^{2+}$ -dependent porphobilinogen synthase. *J. Mol. Biol.* **289**, 591-602.
- Frankenberg, N., Moser, J. & Jahn, D. (2003) Bacterial heme biosynthesis and its biotechnological application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **63**, 115-127.
- Frère, F., Reents, H., Schubert, W.-D., Heinz, D. W. & Jahn, D. (2005) Tracking the evolution of porphobilinogen synthase metal dependence *in vitro*. *J. Mol. Biol.* **345**, 1059-1070.
- Friedmann, H. C. & Thauer, R. T. (1992) *Encyclopedia of Microbiology*, Vol. 3, 1-19, Academic Press, New York.
- Geck, M. K. & Kirsch, J. F. (1999) A novel, definitive test for substrate channeling illustrated with the aspartate aminotransferase/malate dehydrogenase system. *Biochemistry* **38**, 8032-8037.
- Gegner, J. A. & Dahlquist, F. W. (1991) Signal transduction in bacteria: CheW forms a reversible complex with the protein kinase CheA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**, 750-754.
- Gibson, N. & McAlister-Henn, L. (2003) Physical and genetic interactions of cytosolic malate dehydrogenase with other gluconeogenic enzymes. *J. Biol. Chem.* **278**, 25628-25636.

- Gibson, K. D., Laver, W. G. & Neuberger, A. (1958) Initial stages in the biosynthesis of porphyrins. *Biochem. J.* **70**, 71-81.
- Gilbert, W. (1986) The RNA world. *Nature* **319**, 618.
- Gill, S. & von Hippel, P. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* **182**, 319-326.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.
- Henning, M., Grimm, B., Contestabile, R., John, R. A. & Jansonius, J. N. (1997) Crystal structure of glutamate-1-semialdehyde aminomutase: An  $\alpha_2$ -dimeric vitamin B<sub>6</sub>-dependent enzyme with asymmetry in structure and active site reactivity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 4866-4871.
- Hoben, P. & Söll, D. (1985) Glutaminyl-tRNA synthetase of *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* **113**, 55-59.
- Hoober, J. K., Kahn, A., Ash, D. E., Gough, S. & Kannangara, C. G. (1988) Biosynthesis of  $\delta$ -aminolevulinate in greening barley leaves. IX. Structure of the substrate, mode of gabaculine inhibition, and the catalytic mechanism of glutamate 1-semialdehyde aminotransferase. *Carlsburg Res. Commun.* **53**, 11-25.
- Hoskins, A. A., Anand, R., Ealick, S. E. & Stubbe, J. (2004) The formylglycinamide ribonucleotide amidotransferase complex from *Bacillus subtilis*: Metabolite-mediated complex formation. *Biochemistry* **43**, 10314-10327.
- Huang, D.-D. & Wang, W.-Y. (1986) Chlorophyll biosynthesis in *Chlamydomonas* starts with the formation of glutamyl-tRNA. *J. Biol. Chem.* **261**, 13451-13455.
- Hummel, J. P. & Dreyer, W. J. (1962) Measurement of protein-binding phenomena by gel filtration. *Biochim. Biophys. Acta* **63**, 530-532.
- Ilag, L. & Jahn, D. (1992) Activity and spectroscopic properties of the *Escherichia coli* glutamate 1-semialdehyde aminotransferase and the putative active site mutant K265R. *Biochemistry* **31**, 7143-7151.
- Ilag, L., Jahn, D., Eggertson, G. & Söll, D. (1991) The *Escherichia coli* *hemL* gene encodes glutamate-1-semialdehyde aminotransferase. *J. Bacteriol.* **173**, 3408-3413.
- Jahn, D. (1992) Complex formation between glutamyl-tRNA synthetase and glutamyl-tRNA reductase during the tRNA-dependent synthesis of 5-aminolevulinic acid in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Lett.* **314**, 77-80.
- Jahn, D., Michelsen, U. & Söll, D. (1991a) Two glutamyl-tRNA reductase activities in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **266**, 2542-2548.

- Jahn, D., Chen, M.-W. & Söll, D. (1991b) Purification and functional characterization of glutamate-1-semialdehyde aminotransferase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biol. Chem.* **266**, 161-167.
- Jahn, D., Hungerer, C. & Troup, B. (1996) [Unusual pathways and environmentally regulated genes of bacterial heme biosynthesis]. *Naturwissenschaften* **83**, 389-400.
- Jahn, D., Verkamp, E. & Söll, D. (1992) Glutamyl-transfer RNA: a precursor of heme and chlorophyll biosynthesis. *Trends Biochem. Sci.* **17**, 215-219.
- Jordan, P. M. (1994) Porphobilinogen deaminase: mechanism of action and role in the biosynthesis of uroporphyrinogen III. In *The biosynthesis of tetrapyrrole pigments; Ciba Foundation Symposium 180*. (Chadwick, D. J. and Ackrill, K., eds.) Wiley, Chichester, pp. 70-96.
- Jordan, P. M. (1990) in *Biosynthesis of Heme and Chlorophyll* (Dailey, H. A., ed) McGraw-Hill, New York.
- Kannangara, C., Gough, S., Oliver, R. & Rasmussen, S. (1984) Biosynthesis of  $\delta$ -aminolevulinate in greening barley leaves. VI. Activation of glutamate by ligation to RNA. *Carlsberg Res. Commun.* **49**, 417-437.
- Kelly, S. & Price, N. (1997) The application of circular dichroism to studies of protein folding & unfolding. *Biochim. Biophys. Acta* **1338**, 161-185.
- Kikuchi, G., Kumar, A., Talmage, P. & Shemin, D. (1958) The enzymatic synthesis of  $\delta$ -aminolevulinic acid. *J. Biol. Chem.* **233**, 1214-1219.
- Lämmli, U. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Larsen, J. E., Gerdes, K., Light, J. & Molin, S. (1984) Low-copy-number plasmid-cloning vectors amplifiable by derepression of an inserted foreign promoter. *Gene* **28**, 45-54.
- Layer, G., Moser, J., Heinz, D. W., Jahn, D. & Schubert, W.-D. (2003) Crystal structure of coproporphyrinogen III oxidase reveals cofactor geometry of radical SAM enzymes. *EMBO J.* **22**, 6214-6224.
- Layer, G., Pierik, A. J., Trost, M., Rigby, S. E., Leech, H. K., Grage, K., Breckau, D., Astner, I., Jänsch, L., Heathcote, P., Warren, M. J., Heinz, D. W. & Jahn, D. (2006) The substrate radical of *Escherichia coli* oxygen-independent coproporphyrinogen III oxidase HemN. *J. Biol. Chem.* **281**, 15727-15734.
- Lin, S. X., Brisson, A., Liu, J., Roy, P. H. & Lapointe, J. (1992) Higher specific activity of the *Escherichia coli* glutamyl-tRNA synthetase purified to homogeneity by a six-hour procedure. *Protein. Expr. Purif.* **3**, 71-74.

- Loida, P. J., Thompson, R. L., Walker, D. M. & CaJacob, C. A. (1999) Novel inhibitors of glutamyl-tRNA<sup>Glu</sup> reductase identified through cell-based screening of the heme/chlorophyll biosynthetic pathway. *A. Biochem. Biophys.* **372**, 230-237.
- Lorenz, S. (1998) Charakterisierung der Glutamyl-tRNA Reduktase aus *Escherichia coli*. Diplomarbeit, Universität Freiburg im Breisgau.
- Lüer, C. (2003) Struktur- und Funktionsanalyse der Glutamyl-tRNA Reduktase. Diplomarbeit, Technische Universität Braunschweig.
- Lüer, C., Schauer, S., Möbius, K., Schulze, J., Schubert, W.-D., Heinz, D. W., Jahn, D., & Moser, J. (2005) Complex formation between glutamyl-tRNA reductase and glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase in *Escherichia coli* during the initial reactions of porphyrin biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **280**, 18568-18572.
- Madore, E., Florentz, C., Giege, R., Sekine, S.-I., Yokoyama, S. & Lapointe, J. (1999) Effect of modified nucleotides on *Escherichia coli* tRNA<sup>Glu</sup> structure and on its aminoacylation by glutamyl-tRNA synthetase. *Eur. J. Biochem.* **266**, 1128-1135.
- Martens, J.-H., Barg, H., Warren, M. J. & Jahn, D. (2002) Microbial production of vitamin B<sub>12</sub>. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **58**, 275-285.
- Massant, J., Verstreken, P., Durbecq, V., Kholiti, A., Legrain, C., Beeckmans, S., Cornelis, P. & Glansdorff, N. (2002) Metabolite channeling of carbamoyl phosphate, a thermolabile intermediate. *J. Biol. Chem.* **277**, 18517-18522.
- Mathews, C. K. & Sinha, N. K. (1982) Are DNA precursors concentrated at replication sites? *Proc. Natl. Acad. Sci.* **79**, 302-309.
- Mehta, P. K. & Christen, P. (2000) The molecular evolution of pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes. *Advan. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **74**, 129-184.
- Moser, J., Lorenz, S., Hubschwerlen, C., Rompf, A. & Jahn, D. (1999) *Methanopyrus kandleri* glutamyl-tRNA reductase. *J. Biol. Chem.* **274**, 30679-30685.
- Moser, J., Schubert, W.-D., Beier, V., Bringemeier, I., Jahn, D. & Heinz, D. W. (2001) V-shaped structure of glutamyl-tRNA reductase, the first enzyme of tRNA-dependent tetrapyrrole biosynthesis. *EMBO J.* **20**, 6583-6590.
- Nissen, P., Kjeldgaard, S., Thirup, S., Clark, B. F. C. & Nyborg, J. (1996) The ternary complex of aminoacylated tRNA and EF-Tu-GTP. Recognition of a bond and a fold. *Biochimie* **78**, 921-933.
- Nogaj, L. A. & Beale, S. I. (2005) Physical and kinetic interactions between glutamyl-tRNA reductase and glutamate-1-semialdehyde aminotransferase of *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biol. Chem.* **280**, 24301-24307.
- Nooren, I. M. A. & Thornton, J. M. (2003) Diversity of protein-protein interactions. *EMBO J.* **22**, 3486-3492.

- Panek, H. & O'Brian, M. R. (2002) A whole genome view of prokaryotic haem biosynthesis. *Microbiology* **148**, 2273-2282.
- Petříček, M., Petříčková, K., Havlíček, L. & Felsberg, J. (2006) Occurrence of two 5-aminolevulinate biosynthetic pathways in *Streptomyces nodosus* subsp. *asukaensis* is linked with the production of asukamycin. *J. Bacteriol.* **188**, 5113-5123.
- Pontoppidan, B. & Kannangara, C. G. (1994) Purification and partial characterisation of barley glutamyl-tRNA reductase, the enzyme that directs glutamate to chlorophyll biosynthesis. *Eur. J. Biochem.* **255**, 529-537.
- Pugh, C., Harwood, J. & John, R. (1992) Mechanism of glutamate semialdehyde aminotransferase. Roles of diamino- and dioxo-intermediates in the synthesis of aminolevulinate. *J. Biol. Chem.* **267**, 1584-1588.
- Purcarea, C., Ahuja, A., Lu, T., Kovari, L., Guy, H. I. & Evans, D. R. (2003) *Aquifex aeolicus* aspartate transcarbamoylase, an enzyme specialized for the efficient utilization of unstable carbamoyl phosphate at elevated temperature. *J. Biol. Chem.* **278**, 52924-52935.
- Randau, L., Schauer, S., Ambrogelly, A., Salazar, J. C., Moser, J., Sekine, S.-I., Yokojama, S., Söll, D. & Jahn, D. (2004) tRNA recognition by glutamyl-tRNA reductase. *J. Biol. Chem.* **279**, 34931-34937.
- Raux, E., Leech, H. K., Beck, R., Schubert, H. L., Santander, P. J., Roessner, C. A., Scott, A. I., Martens, J. H., Jahn, D., Thermes, C., Rambach, A. & Warren, M. J. (2003) Identification and functional analysis of enzymes required for precorrin-2 dehydrogenation and metal ion insertion in the biosynthesis of sirohaem and cobalamin in *Bacillus megaterium*. *Biochem. J.* **370**, 505-516.
- Righetti, P., Gianazza, E., Gelfi, C. & Chairi, M. (1990) In *Gel electrophoresis of proteins: a practical approach*. 2 edition, Oxford University Press.
- Rudolph, J. & Stubbe, J. (1995) Investigation of the mechanism of phosphoribosylamine transfer from glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase to glycineamide ribonucleotide synthetase. *Biochemistry* **34**, 2241-2250.
- Sambrook, J., Fritsch, E. & Maniatis, T. (1989) In *Molecular cloning: A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Schauer, S. (2003) Die Glutamyl-tRNA Reduktase aus *Escherichia coli*. Doktorarbeit, Technische Universität Braunschweig.
- Schauer, S., Chaturvedi, S., Randau, L., Moser, J., Kitabatake, M., Lorenz, S., Verkamp, E., Schubert, W.-D., Nakayashiki, T., Murai, M., Wall, K., Thomann, H. U., Heinz, D. W., Inokuchi, H., Söll, D. & Jahn, D. (2002) *Escherichia coli* glutamyl-tRNA reductase. *J. Biol. Chem.* **277**, 48657-48663.



- Schauer, S., Lüer, C. & Moser, J. (2003) Large scale production of biologically active *Escherichia coli* glutamyl-tRNA reductase from inclusion bodies. *Protein. Expr. Purif.* **31**, 271-275.
- Schobert, M. & Jahn, D. (2002) Regulation of heme biosynthesis in non-phototrophic bacteria. *J. Mol. Microbiol.* **4**, 287-294.
- Schulze, J. O., Schubert, W.-D., Moser, J., Jahn, D., & Heinz, D. W. (2006) Evolutionary relationship between initial enzymes of tetrapyrrole biosynthesis. *J. Mol. Biol.* **358**, 1212-1220.
- Sekine, S.-I., Nureki, O., Sakamoto, K., Niimi, T., Tateno, M., Go, M., Kohno, T., Brisson, A., Lapointe, J. & Yokoyama, S. (1996) Major identity determinants in the “augmented D helix” of tRNA<sup>Glu</sup> from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **256**, 685-700.
- Shemin, D. & Rittenberg, D. (1945) The utilization of glycine for the synthesis of a porphyrin. *J. Biol. Chem.* **159**, 567-568.
- Shemin, D. & Russel, C. S. (1953)  $\delta$ -Aminolevulinic acid, its role in the biosynthesis of porphyrins and purins. *J. Amer. chem. Soc.* **75**, 4873-4874.
- Smith, M. A., Kannangara, C. G., Grimm, B. & von Wettstein, D. (1991) Characterization of glutamate-1-semialdehyde aminotransferase of *Synechococcus*. Steady-state kinetic analysis. *Eur. J. Biochem.* **202**, 749-757.
- Spivey, H. O. & Ovadi, J. (1999) Substrate channeling. *Methods* **19**, 306-321.
- Srere, P. A. (1987) Complexes of sequential metabolic enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 89-124.
- Stange-Thomann, N., Thomann, U., Llyod, A., Lyman, H., & Söll, D. (1994) A point mutation in *Euglena gracilis* chloroplast tRNA<sup>Glu</sup> uncouples protein and chlorophyll biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 7947-7951.
- Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. & Dubendorff, J. W. (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* **185**, 60-89.
- Sylvers, L., Rogers, K., Shimizu, M., Ohtsuka, E. & Söll, D. (1993) A 2-thiouridine derivative in tRNA<sup>Glu</sup> is a positive determinant for aminoacylation by *Escherichia coli* glutamyl-tRNA synthetase. *Biochemistry* **32**, 3836-3841.
- Tabor, S. & Richardson, C. C. (1985) A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**, 1074-1078.
- Tang, L., Breinig, S., Stith, L., Mischel, A., Tannir, J., Kokona, B., Fairman, R. & Jaffe, E. K. (2006) Single amino acid mutations alter the distribution of human porphobilinogen synthase quaternary structure isoforms (Morpheesins). *J. Biol. Chem.* **281**, 6682-6690.

- Thauer, R. K. & Bonacker, L. G. (1994) Biosynthesis of coenzyme F430, a nickel porphinoide involved in methanogenesis. In *The biosynthesis of tetrapyrrole pigments; Ciba Foundation Symposium 180*. (Chadwick, D. J. and Ackrill, K., eds.) Wiley, Chichester, pp. 210-227.
- Vavilin, D. V. & Vermaas, W. F. J. (2002) Regulation of the tetrapyrrole biosynthetic pathway leading to heme and chlorophyll in plants and cyanobacteria. *Physiol. Plant.* **115**, 9-24.
- Verkamp, E., Backman, V. M., Björnsson, J. M., Söll, D. & Eggertsson, G. (1993) The periplasmic dipeptide permease system transports 5-aminolevulinic acid in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**, 1452-1456.
- Verkamp, E. & Chelm, B. (1989) Isolation, nucleotide sequence, & preliminary characterization of the *Escherichia coli* K-12 *hema* Gene. *J. Bacteriol.* **171**, 4728-4735.
- Verkamp, E., Jahn, M., Jahn, D., Kumar, A. & Söll, D. (1992) Glutamyl-tRNA reductase from *Escherichia coli* and *Synechocystis* 6803. *J. Biol. Chem.* **267**, 8275-8280.
- Vothknecht, U. C., Kannangara, C. G. & von Wettstein, D. (1996) Expression of catalytically active glutamyl-tRNA reductase in *Escherichia coli* as a fusion protein with glutathione S-transferase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 9287-9291.
- Vothknecht, U. C., Kannangara, C. G. & von Wettstein, D. (1998) Barley glutamyl-tRNA<sup>Glu</sup> reductase: mutations affecting haem inhibition and enzyme activity. *Phytochemistry* **47**, 513-519.
- Wakil, S. J., Stoops, J. K. & Joshi, V. C. (1983) Fatty acid synthesis and its regulation. *Annu. Rev. Biochem.* **52**, 537-579.
- Wang, L., Elliott, M. & Elliott, T. (1999) Conditional stability of the *HemA* protein (Glutamyl-tRNA reductase) regulates heme biosynthesis in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **181**, 1211-1219.
- Weinstein, J. D. & Beale, S. I. (1983) Separate physiological roles and subcellular compartments for two tetrapyrrole biosynthetic pathways in *Euglena gracilis*. *J. Biol. Chem.* **258**, 6799-6807.
- Weinstein, J. D. & Beale, S. I. (1985) RNA is required for enzymatic conversion of glutamate to  $\delta$ -aminolevulinate by extracts of *Chlorella vulgaris*. *Arch. Biochem. Biophys.* **239**, 87-93.
- Weygand-Durašević, I., Schwob, E. & Söll, D. (1993) Acceptor end binding domain interactions ensure correct aminoacylation of transfer RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**, 2010-2014.
- Woese, C. R. (1987) Bacterial evolution. *Microbiol. Reviews* **51**, 221-271.

Yong, H., Thomas, G. A. & Peticolas, W. L. (1993) Metabolite-modulated complex formation between  $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase and lactate dehydrogenase. *Biochemistry* **32**, 11124-11131.

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Dieter Jahn, der es mir ermöglicht hat die letzten Jahre in seiner Gruppe zu arbeiten, der immer ein offenes Ohr für die kleinen und großen Probleme hatte und der mich immer wieder durch seine positive Energie motiviert hat.

Als nächstes möchte ich mich bei Prof. Dr. Dirk W. Heinz für die freundliche Übernahme des Korreferats und bei Prof. Dr. Ralf R. Mendel für die Teilnahme an der Prüfungskommission bedanken.

Dr. Jürgen Moser möchte ich für die ständige Unterstützung und Diskussionsbereitschaft danken. Ihm und Dr. Stefan Schauer danke ich auch für die geduldige Einarbeitung in Thema und Arbeitstechniken. Außerdem möchte ich mich bei Dr. Lennart Randau und Kalle Möbius für ihre Zusammenarbeit und Diskussionsbereitschaft bedanken.

Bei Dr. Wolf-Dieter Schubert möchte ich mich für die Einblicke in die GluTR-Struktur, die Erstellung der verschiedenen GluTR-Modelle und das Korrekturlesen des zweiten Papers bedanken.

Ein großes Dankeschön an Dr. Rebekka Biedendieck, Simone Virus, Denise Wätzlich und Dr. Ronja Tasler für die tolle Zeit, ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung auch über die Arbeit hinaus.

Für die freundliche Arbeitsatmosphäre danke ich allen momentanen und ehemaligen Mitarbeitern der AG Jahn.

Am Ende geht mein größter Dank natürlich an meine Familie und an Bernward, die mir immer wieder Mut gemacht und mich unterstützt haben. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.